



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA COALHADA FERMENTADA DE
LEITE DE BÚFALA SOBRE A QUALIDADE DO QUEIJO MUÇARELA
ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

CRISTIANE SANTOS DE JESUS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA COALHADA FERMENTADA DE
LEITE DE BÚFALA SOBRE A QUALIDADE DO QUEIJO MUÇARELA
ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

CRISTIANE SANTOS DE JESUS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Co-orientador: DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL

2014

"Tudo é do Pai, toda honra e toda glória,
É Dele a vitória alcançada em minha vida."

A DEUS

Dedico

Agradecimentos

À **Deus**, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Neuza** e **Carlito**, pelo amor, esforço, compreensão e pelo estímulo incansável ao longo dessas e de outras caminhadas. Graças a vocês meu sonho se tornou possível!!!

À todos os meus familiares pelo apoio e carinho. Em especial ao meu irmão Dene que me deu de presente um sobrinho lindo (**O príncipe Pedro**), trazendo muitas alegrias, em meio aos obstáculos.

Aos meus primos que estavam sempre torcendo por mim, **Reiza**, **Manley**, **Júnior** e minha amiga **Laís**.

À minha orientadora Prof^a. **Sibelli Passini** pelo carinho, incentivo e pela grande confiança em mim, me passando tranquilidade para dar continuidade aos trabalhos. Uma grande orientadora! Levarei comigo seus ensinamentos sempre, guardando a mensagem que um dia ela me disse: Cris, as coisas sempre darão certo, se formos corretos. E assim se fez, deu tudo certo!!!

Ao meu co-orientador Prof^o **Sérgio Fernandes** pela amizade, incentivo e confiança depositada.

À prof^a. **Renata Bonomo** e Prof. **Rafael Fontan** por terem disponibilizado o laboratório que coordenam e pelo auxílio.

Ao Prof. **Paulo Bonomo** por ter me auxiliado na estatística sempre.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (**UESB**), pelas instalações e por disponibilizar os funcionários para condução do experimento.

À **Capex**, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao laticínio **Rocha** pela doação do leite e ao laticínio **Pitty** pelas instalações e colaboração.

As minhas amigas **Michelle Pignata** e **Juliane** pelo carinho, incentivo, companheirismo, diversão e amizade.

Ao grupo de Estudos em Leite (**GEL**), **Mirelle**, **Dani**, **Abdias**, **Amanda**, **Ben Hur**, **Grazy** e **João** pela colaboração e apoio durante esse período.

A **Maíra**, **Thais**, **Flora** e **Evandro**, uma família maravilhosa que tive o prazer de conhecer e que me apoiaram bastante.

Aos professores Egito Vasconcelos e Renata Bonomo por participarem da banca de defesa, contribuindo para o enriquecimento do trabalho.

Aos amigos que fiz durante essa minha caminhada e com certeza lembrarei sempre, **Gustavo**, **Dorinha**, **Jeanny**, **Dimitre**, **Dani Kulka** e **Jamile**.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

JESUS, C. S. **Efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a qualidade do queijo muçarela armazenado sob refrigeração.** Itapetinga – BA: UESB, 2013. 57p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).*

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito do tempo congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala e da refrigeração dos queijos sobre a composição centesimal, características físicas, químicas, rendimento, derretimento e índice proteolítico da muçarela de búfala. O experimento foi conduzido em um Laticínio na cidade de Itapetinga – BA e os tratamentos foram compostos por tempos de congelamento da coalhada fermentada (0, 40, 80, 120 e 160 dias) de leite de búfala e tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala (10, 20 e 30 dias) processados a partir da coalhada congelada. As amostras dos queijos muçarela foram submetidas a análises de composição centesimal, físicas, químicas, rendimento, derretimento e índice de proteólise. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial 5 x 3 e os resultados obtidos foram analisados por meio de análise de regressão, adotando-se $\alpha = 0,05$. Com relação aos diferentes tempos de refrigeração do queijo muçarela não foi verificada diferença significativa para a composição centesimal, entretanto foi observado um efeito significativo com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada. Apenas o congelamento da coalhada fermentada teve influência sobre o parâmetro pH e para o parâmetro acidez houve interação dos tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala com os tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração. Não houve efeito do congelamento da coalhada fermentada sobre a capacidade de derretimento dos queijos, porém os tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração influenciaram significativamente no aumento da capacidade de derretimento. A proteólise foi mais rápida nos queijos preparados a partir de coalhada congelada, com a taxa dependendo do tempo de armazenamento em temperaturas de congelamento. Pode-se concluir que a utilização de coalhada congelada de leite de búfala na fabricação de queijos muçarela pode ser uma alternativa viável para superar a escassez sazonal do leite de búfala.

Palavras-chave: Sazonalidade, eletroforese, composição.

*Orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB e Co-orientador: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB.

ABSTRACT

JESUS, C. S. **Effect of freezing weather curd fermented buffalo milk on the quality of mozzarella cheese stored under refrigeration. Itapetinga - BA: UESB, 2013. 57p. (Dissertation - MSc in Engineering and Food Science) *.**

The objective of this study was to evaluate the effect of frozen storage of fermented curd buffalo milk cheeses and cooling on the chemical composition, physical, chemical, yield, melting and proteolysis index of buffalo mozzarella. The experiment was conducted in a Dairy in the city of Itapetinga - BA. The treatments consisted of freezing times of curd fermented (0, 40, 80, 120 and 160 days) of buffalo milk and times chilling buffalo mozzarella cheese (10, 20 and 30 days) processed from frozen curd. The samples of mozzarella cheese were analyzed for proximate composition, physical, chemical, yield, melting and ripening index. The experimental design was completely randomized with three replications in a factorial 5 x 3 and the data obtained were analyzed using regression analysis, adopting $\alpha = 0.05$. With respect to the different times of cooling mozzarella cheese significant difference was not observed for proximate composition, however a significant effect with respect to the times of freezing the fermented curd was observed. Just freezing the fermented curd influenced the pH parameter and the parameter acidity was no interaction of time freezing the fermented buffalo milk curd with storage time under refrigeration cheeses. No effect of freezing the fermented curd on the ability to melt the cheese, but the storage time of refrigerated cheeses significantly influenced the increase in melting capacity. The proteolysis was faster in cheese prepared from frozen curd, with the rate depending on the time of storage in freezing temperatures. It can be concluded that the use of frozen curd buffalo milk in the manufacture of mozzarella cheese can be a viable alternative to overcome seasonal shortages of buffalo milk.

Keywords: Seasonality, electrophoresis, composition.

*Advisor: Sibelli Passini Barbosa Stinger, DSc, UESB and Co-supervisor: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc, UESB.

ÍNDICE

Introdução e Justificativa	8
CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVOS	9
1.1 Revisão Bibliográfica.....	9
1.1.1 Bubalinocultura no Brasil.....	9
1.1.2 Leite de Búfala	10
Tabela 1. Composição química do leite bubalino, segundo diferentes autores.....	11
1.1.3 Muçarela de Búfala	12
1.1.4 Efeito do congelamento na coalhada fermentada de leite de búfala	13
1.1.5 Propriedades da Muçarela de Búfala armazenada em temperaturas de refrigeração	14
1.1.6 Proteólise.....	15
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo Geral.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	18
1.4 Referências	18
CAPÍTULO 2 – EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA COALHADA FERMENTADA DE LEITE DE BÚFALA SOBRE A QUALIDADE NUTRICIONAL DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO	25
Resumo.....	26
Abstract	27
2.1 INTRODUÇÃO	28
2.2 Material e Métodos.....	29
2.2.1 Obtenção da Matéria-Prima	29
2.2.2 Processamento dos queijos.....	29
2.2.3 Filagem da massa	30
2.2.4 Análises do Queijo Muçarela	31
2.2.4.1 Composição centesimal.....	31
2.2.4.2 Análises Físico-químicas.....	31
2.2.4.2.1 Determinação do pH.....	31

2.2.4.2.2 Determinação da Acidez	31
2.2.4.3 Determinação da Cor.....	31
2.2.5 Análises estatísticas.....	32
2.3 Resultados e Discussão	32
2.3.1 Composição Centesimal.....	32
Tabela 1. Médias, equações de regressão ajustadas, coeficientes de variação e coeficientes de determinação (R^2) para a composição do queijo muçarela de búfala de acordo com diferentes tempos de congelamento da coalhada fermentada.....	33
2.3.2 Análises Físico-químicas.....	34
Figura 1. Comportamento do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre pH dos queijos Muçarela de Búfala.....	35
Figura 2. Superfície de resposta do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre o parâmetro acidez do queijo muçarela de búfala estocado em diferentes tempos de refrigeração.	36
2.3.3 Análise de Cor.....	37
Figura 3. Superfície de resposta do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre o parâmetro Luminosidade (L^*) do queijo muçarela de búfala estocado em diferentes tempos de refrigeração.	37
Tabela 2. Médias, equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação (R^2) para os parâmetros de cromaticidade a^* e b^* e saturação C^* do queijo muçarela de búfala obtidos a partir da coalhada fresca e congelada.	38
Tabela 3. Médias do parâmetro tonalidade h do queijo muçarela de búfala de acordo com diferentes tempos de congelamento da coalhada fermentada.	39
2.4 Conclusão.....	39
2.5 Referências.....	40
CAPÍTULO 3. CONGELAMENTO DA COALHADA FERMENTADA DE LEITE DE BÚFALA E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A PROTEÓLISE E CAPACIDADE DE DERRETIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO.....	44
Resumo.....	45
Abstract	46
3.1 INTRODUÇÃO	47

3.2 Material e Métodos.....	48
3.2.1 Obtenção da Matéria-Prima	48
3.2.2 Processamento dos queijos.....	48
3.2.3 Filagem da massa	49
3.2.4 Capacidade de Derretimento	49
3.2.5 Índice de Proteólise	50
3.2.5.1 Método químico	50
3.2.5.2 Método Eletroforético	51
3.2.6 Análises estatísticas.....	52
3.3 Resultados e Discussão	52
3.3.1 Capacidade de Derretimento	52
Figura 1. Comportamento da Capacidade de Derretimento dos queijos Muçarela de Búfala em função dos diferentes de tempos de estocagem sob refrigeração.....	53
3.3.2 Índice de proteólise por meio do método químico	54
Tabela 3. Médias dos parâmetros proteólise, índice de extensão e profundidade dos queijos muçarela estocados em diferentes tempos de refrigeração obtidos a partir de coalhada fresca e congelada.....	55
3.3.3 Índice de proteólise por meio do método eletroforético.....	55
Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do queijo muçarela de búfala revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20 µG de proteínas em cada poço. M, massa molecular padrão; T0 – tratamento sem congelamento da massa fermentada; T40 – tratamento da massa fermentada congelada por 40 dias; T80 – tratamento da massa fermentada congelada por 80 dias; T120 – tratamento da massa fermentada congelada por 120 dias; T160 – tratamento da massa fermentada congelada por 160 dias, todos os tratamentos analisados nos tempo de 10, 20 e 30 dias de estocagem; α _s -CN, alfa _s -caseína; β-CN, beta-caseína; κ-CN, kappa-caseína; γ-CN, gamas-caseínas.	56
Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do queijo muçarela de búfala revelado com Nitrato de Prata. Depositaram-se 20 µG de proteínas em cada poço. PM, peso molecular padrão; T0 – tratamento sem congelamento da massa fermentada; T40 – tratamento da massa fermentada congelada por 40 dias; T80 – tratamento da massa fermentada congelada por 80 dias, T120 – tratamento da massa fermentada congelada por 120 dias; T160 – tratamento da massa fermentada congelada por 160 dias, todos os tratamentos analisados nos tempo de 10, 20 e 30 dias de estocagem; α _s -CN, alfa _s -caseína; β-CN, beta-caseína; κ-CN, kappa-caseína; γ-CN, gamas-caseínas.	58
3.4 Conclusão.....	60

3.5 Referências.....	60
----------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos

α – alfa

β – beta

κ – kapa

γ - gama

SDS - Dodecilsulfato de Sódio

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

RP – HPLC - cromatografia líquida em fase reversa de elevado desempenho

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

NT – Nitrogênio Total

NS – Nitrogênio solúvel

EST – extrato seco total

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

REG – REGRESSÃO

R^2 – Coeficiente de determinação

CV – Coeficiente de variação

NNP – Nitrogênio não proteico

NNC – Nitrogênio não caseinoso

AOAC – Association of Official Analytical Chemists International

C – Caseína

PV – proteína verdadeira

N – nitrogênio

IEP – Índice de extensão da proteólise

IPP – Índice de profundidade da proteólise

CD – Capacidade de derretimento

EST – Extrato seco total

GES – Gordura no extrato seco

Introdução e Justificativa

A bubalinocultura é mais uma opção para a pecuária nacional, pois estudos indicam maior eficiência econômica desta espécie quando comparado aos bovinos. No Brasil, a muçarela destaca-se como um dos principais queijos elaborados com leite de búfala, possuindo alta aceitação pelos consumidores com excelentes perspectivas de mercado. No entanto fatores que se relacionam com as características reprodutivas dos búfalos interferem de maneira negativa na oferta e comercialização dos produtos lácteos.

Para laticínios especializados em produção de muçarela, as variações sazonais na disponibilidade do leite de búfala, associado ao preço mais elevado em relação ao leite de vaca, compromete seriamente a entrega dos produtos no período de entressafra. Dessa forma, para contornar a sazonalidade na produção, muitos laticínios frequentemente misturam o leite de vaca com o leite de búfala na produção dos queijos ou ainda congelam a muçarela por um prazo de até seis meses, sem garantia sobre a qualidade no término do período de congelamento. Existem evidências que laticinistas tem reembalado queijos e colocado nova data de validade e fabricação, para que seja aceito no mercado.

Visto que a disponibilidade do queijo muçarela fabricado no Brasil é limitada pela produção sazonal, o congelamento da coalhada de leite de búfala torna-se uma alternativa viável para prolongar a oferta dos queijos no mercado. Porém, algumas alterações são produzidas durante o ciclo de congelamento e descongelamento, as quais podem levar à desestabilização de proteínas e gordura na matriz proteica, afetando a qualidade da muçarela.

A muçarela de búfala caracteriza-se pelo alto teor de gordura no extrato seco, elevada umidade, sabor levemente ácido e coloração esbranquiçada devido a ausência de pigmentos carotenoides. Além destas características, a qualidade e aceitação deste queijo pelos consumidores é determinada pelo teor de minerais, pH, proteólise e capacidade de derretimento, fatores estes, que ditam as propriedades tecnológicas resultantes do queijo.

Poucos estudos foram conduzidos no sentido de verificar o efeito do tempo de congelamento da coalhada de búfala sobre a qualidade da muçarela, nesse sentido é importante avaliar a extensão das mudanças físicas e químicas causadas pelo tempo de estocagem da coalhada congelada no queijo produzido.

Considerando a necessidade de contornar a sazonalidade na produção de muçarela, este trabalho justifica-se na observação da possibilidade real de se produzir queijo muçarela a partir de coalhada congelada de leite de búfala, fazendo estudos sobre a qualidade nutricional

da muçarela no decorrer de sua vida de prateleira para que sejam controladas as alterações que possam surgir durante o tempo de estocagem da coalhada.

CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO E OBJETIVOS

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Bubalinocultura no Brasil

Os búfalos domésticos pertencem à família Bovidae, à subfamília Bovinae e à espécie *Bubalus bubalis*. Esta espécie teve sua origem no continente asiático, se difundido pela África, Europa, Oceania e América. No Brasil, foram introduzidos na Ilha de Marajó, em 1895, espalhando-se por todas as regiões fisiográficas, predominando na região Norte, com um efetivo acima de 50% do total nacional (DAMÉ, 2006).

Dos bubalinos introduzidos no Brasil, quatro raças são reconhecidas oficialmente pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah, todos denominados búfalos de rio, e a raça Carabao, pertencente ao grupo de búfalos de pântano (ALBUQUERQUE et al., 2006; ROSA, 2007). Dentre os búfalos de rio, a raça Murrah, originária do norte da Índia, é a raça mais difundida por sua aptidão leiteira, principalmente, nos sistemas intensivos de criação (ALBUQUERQUE et al., 2006).

O efetivo de bubalinos, no ano de 2011, era de 1,277 milhão de cabeças, representando aumento de 7,8% em relação ao ano anterior. Os búfalos concentravam-se nas Regiões Norte e Nordeste do País, destacando-se os Estados do Pará (38,0%), do Amapá (18,4%) e do Maranhão (6,5%). Dos estados do Nordeste o Maranhão conta com o maior efetivo (82.650 mil cabeças), seguido da Bahia com um efetivo de 27.171 mil cabeças (IBGE, 2011).

O búfalo é considerado um animal de tripla aptidão, por estar adaptado à produção de leite, carne e tração. Em função de sua rusticidade, são animais bastante adaptados a solos de baixa fertilidade, terrenos alagadiços, sendo capazes de converter alimentos fibrosos em proteínas de alto valor (carne e leite), apresentando longevidade e possibilidade de ocupar áreas geográficas não adequadas às demais espécies de ruminantes. Nos países latino-americanos, especialmente no Brasil, sua contribuição nestes aspectos tem crescido nos últimos anos, e deverá se tornar de grande importância, não só para as propriedades rurais como também para as empresas produtoras e processadoras de alimentos (OLIVEIRA, 2005).

As búfalas apresentam menor período de lactação (cerca de um mês a menos), maior duração da gestação (em torno de 310 dias) e maior tempo de repouso entre as lactações

(período seco de cerca de 95 dias) que as vacas, o que permite à búfala acumular maior quantidade de reservas corporais para utilizar na lactação seguinte (CAMPINELE et al., 2007). No entanto, a estacionalidade reprodutiva dos búfalos é sem dúvida a característica fisiológica que exerce o maior impacto econômico na atividade. A concentração dos partos das búfalas nos meses de março a junho determina a concentração da produção de leite até o mês de setembro com ausência da matéria-prima no verão (BASTIANETTO, 2005).

Os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos. Para criações destinadas à produção de carne, este é um fator desejável, pois concentra as atividades de manejo. Entretanto, para a produção de leite e para laticínios especializados em fabricação de queijos especiais com leite de búfala, a concentração das parições é um fator indesejável (PEREIRA et al., 2007).

1.1.2 Leite de Búfala

A produção mundial de leite da exploração agropecuária de todas as espécies animais teve um crescimento de 1,8% no ano de 2010. Deste total, o leite de vacas representa 83% e apresentou crescimento de 1,6%, enquanto a produção de leite de búfala cresceu 3,1% e é responsável por 13% do total mundial de produção de leite na fazenda. Este crescimento de leite na fazenda resultou em aumento na produção de derivados lácteos no mundo (YONKERS, 2011).

É importante salientar que, nas regiões onde se desenvolve a bubalinocultura leiteira, o produtor recebe um valor diferenciado pelo litro de leite in natura de búfala, em torno de 40 a 50% a mais que o valor pago pelo litro do leite in natura de vaca (AMARAL, 2005a).

Usualmente, as búfalas apresentam produção ascendente a partir do parto, com picos em torno do 2º mês de lactação, com produção progressiva que se reduz até o final da lactação, o que ocorre em torno de 260-280 dias. Com o evoluir da lactação, não somente a produção, mas também a composição química do leite produzido se altera significativamente e, em proporções muito maiores do que se observa em vacas, com os teores de proteína, gordura e sólidos totais aumentando à medida que se avança a duração da lactação (CAMPANILE et al., 2007).

Na Tabela 1, são sumarizados os teores médios para os componentes do leite de búfala obtidos por diferentes autores.

Tabela 1. Composição química do leite bubalino, segundo diferentes autores.

Bubalino	Autores	Água %	Matéria seca %	Gordura %	SNG %	Proteína %	Minerais %
Jafarabadi	Verruma & Salgado (1994)	83,00	17,00	8,16	---	4,50	0,70
Mediterrâneo e Murrah	Coelho et al., (2004)	---	17,23	6,83	---	4,20	---
Murrah	Cunha Neto et al., (2005)	---	17,34	6,82	10,40	4,28	---
Murrah	Figueiredo et al., (2010)	81,99	---	8,14	---	4,44	---
Murrah	Fernandes et al., (2010)	---	16,14	6,52	---	4,10	---
Murrah	Andrade et al., (2011)	---	16,84	7,17	---	4,29	---

Segundo Coelho et al. (2004), as diferenças apontadas na Tabela 1 podem ser atribuídas a uma série de fatores, tais como as condições de clima, de alimentação, raça, estágio de lactação e manejo.

O leite de búfala apresenta alto valor nutricional, altos níveis de gordura, proteínas e minerais, podendo ser utilizado tanto para o consumo in natura como matéria-prima para elaboração de produtos lácteos, que podem variar conforme a cultura de cada região. Portanto, o grande diferencial do leite bubalino é justamente seu rendimento em sólidos que supera consideravelmente o leite de vaca (ARAÚJO, 2011).

O leite de búfala destaca-se pelo sabor adocicado e coloração branco opaca, provocada pela ausência de pigmentos carotenoides (AMARAL et al., 2005b). Apresenta micelas de caseínas grandes, proporcionando rápida coagulação no processamento, com menos água e, conseqüentemente, produtos de corpo firme. A gordura é constituída de glóbulos maiores e de coloração clara; os ácidos caprótico, caprílico e cáprico são encontrados em menor quantidade e, quando liberados nos derivados lácteos, contribuem com o sabor e aroma característicos (MESQUITA, 2001).

A partir do leite de búfala, podem-se elaborar diversos tipos de queijos, manteiga, iogurte, dentre outros. Entretanto, a muçarela é, sem dúvida, o produto principal, sendo a maior parte deste leite destinada à sua fabricação (BUZI, 2009).

1.1.3 Muçarela de Búfala

Conforme portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997, que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela), entende-se por queijo Queijo Mozzarella o queijo que se obtém por filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

A muçarela é um tipo de queijo tradicionalmente feito a partir de leite bubalino integral, com alto teor de gordura, o que lhe confere paladar delicado. Trata-se de um queijo fresco de massa filada, originário do sul da Itália (região de Campana), no século XVI. A região da Campana possui o selo de origem da autêntica Muçarela (TEIXEIRA, 2005). Na Itália, apesar da importância da pasteurização, a muçarela é elaborada a partir do leite cru de búfala, com o propósito de garantir as características sensoriais particulares e inerentes ao produto (BUZI, 2009).

No Brasil, a muçarela de leite de búfala representa 70% da produção de derivados deste leite, cujo rendimento industrial está diretamente ligado ao teor de sólidos do leite, em especial, aos teores de gorduras e proteínas (CAMPANILE et al., 2007; VIEIRA et al., 2011). Para que se tenha um rendimento otimizado na fabricação da muçarela, estima-se que a relação entre os teores de gordura e proteínas no leite deve apresentar uma relação próxima de 2:1 (CAMPANILE et al., 2007).

Na muçarela fabricada tradicionalmente, o leite cru integral é inoculado geralmente com culturas termófilas contendo *Streptococcus thermophilus* e bacilos lácticos para alcançar pH de 5,3 a 5,4 necessário para filagem e coalho cuja função hidrolisar a ligação phe105-met106 da k-CN provocando a coagulação do leite (PERRY, 2004; MONTEIRO et al., 2007).

Considerando que no Brasil a legislação exige a pasteurização do leite para produção de muçarela de búfala, o ingrediente que se torna indispensável é o cloreto de cálcio, que tem como objetivo repor parte do cálcio solúvel precipitado pelo tratamento térmico da pasteurização, sendo imprescindível para que ocorra a coagulação, aumentando a firmeza da coalhada e conseqüentemente facilitando a filagem (MONTEIRO et al., 2007).

A elasticidade adequada ao queijo é dada pela conversão da dicálcio-paracaseína em monocálcio-paracaseína, realizada pelo ácido láctico durante a exposição à alta temperatura da água, por isso a acidificação da massa é uma etapa muito importante e deve ser cuidadosamente controlada (TEIXEIRA, 2005).

1.1.4 Efeito do congelamento na coalhada fermentada de leite de búfala

O uso da técnica de conservação por meio de congelamento está bem estabelecido para muitos alimentos, porém muito pouca atenção tem sido dada à possibilidade da utilização de congelamento para conservar o leite de búfala por meio da coalhada e posterior fabricação de queijos (HUSSAIN, et al., 2012b).

A utilização da coalhada congelada para a produção de queijos no período da entressafra pode ser uma alternativa viável para contornar a sazonalidade da produção leiteira, no entanto, algumas alterações no processo de congelamento da coalhada podem prejudicar a qualidade do queijo (KATIKI, 2006). A coalhada é uma matriz proteica e, portanto, sua degradação afetará as características sensoriais, propriedades químicas, pH e a capacidade de retenção de água (NADAL, 1995; KATIKI, 2006).

Quando tecidos orgânicos são congelados, as substâncias dissolvidas no líquido das células concentram-se e congelam no ponto de congelamento. No descongelamento, nem toda a água removida, anteriormente ligada a proteínas ou carboidratos, é capaz de retornar ao seu estado original, tornando-se livre e formando o "drip", que é o líquido exsudado após o congelamento e descongelamento. A quantidade de "drip" depende do método de congelamento, bem como da temperatura durante o armazenamento e suas flutuações. Dessa forma, o método de descongelamento assume fundamental importância principalmente naqueles produtos em que a textura é importante, nestes casos, o descongelamento lento é preferencial, já que nestas condições a água pode retornar lentamente à sua posição original no tecido, anterior ao congelamento, através da difusão (COLLA, 2003).

O congelamento é um dos melhores métodos para manter a cor, o aroma e a aparência de muitos alimentos (FRANCO, 1996). No entanto, apesar de ser considerado o mais recomendado para conservar alimentos por longos períodos, suas vantagens podem ser afetadas pelos efeitos deletérios ao produto, cuja severidade é tanto menor quanto mais rápida é a remoção de energia (CORREIA, 2008). Isso pode ser explicado pelo fato de que no congelamento lento há a formação de grandes cristais de gelo, pontiagudos, que provocam o rompimento das estruturas celulares, tendo como consequência a perda de suco celular e, portanto, redução do valor nutricional, durante o descongelamento. Em oposição, o congelamento rápido evita a formação de grandes cristais de gelo e a ruptura de membranas celulares, mantendo o valor nutricional do alimento (SILVA, 2006).

1.1.5 Propriedades da Muçarela de Búfala armazenada em temperaturas de refrigeração

A muçarela de búfala caracteriza-se por apresentar alto teor de umidade (55 a 62%), alto teor de gordura no extrato seco (>45%), textura suave, sabor agradável e levemente ácido (APONTE et al., 2010). Possui aparência fibrosa devido à formação de fibras de proteínas durante o processo de filagem (McMAHON et al., 2005) e cor esbranquiçada, a qual está intimamente ligada não só a gordura do leite, como também ao tamanho dos glóbulos de gordura dispersos na matriz proteica (PERRY, 2004; CHEN & LIU, 2012).

O percentual de gordura, teor de umidade, teor de minerais especialmente o cálcio, pH e proteólise são alguns dos fatores que ditam as propriedades tecnológicas resultantes do queijo muçarela, tais como, elasticidade, derretimento, formação de óleo livre e cor (SAMEEN et al., 2008), as quais determinam a qualidade e aceitação deste queijo pelos consumidores (COSTABEL et al., 2007). Estudos vêm demonstrando que a composição química e o pH, assim como a proteólise também são importantes para o desenvolvimento da textura do queijo muçarela (McMAHON et al., 2005).

Segundo Ganesan et al. (2012) a perda da integridade textural e desenvolvimento de sabor inaceitável do queijo muçarela de búfala fresco está previsto entre duas e quatro semanas de armazenamento refrigerado, o que sugere que as bactérias incidentes crescem lentamente em temperaturas de refrigeração. Sendo assim o baixo pH, o teor de sal entre 0,7 a 2% e a temperatura de refrigeração, retardam o crescimento bacteriano, mas não suficientes para impedir a deterioração do queijo muçarela de búfala.

O prazo de validade da muçarela de búfala está estritamente ligado com a tecnologia de fabricação e a matéria-prima utilizada (leite não pasteurizado). A muçarela de búfala artesanal obtida a partir de leite pasteurizado e soro de leite natural pode ser armazenada e imersa em uma solução matriz por 3 a 4 dias sob refrigeração entre 4 e 10°C, sem perda das suas características, tais como, cor branca, coalhada macia e elástica e gosto peculiar fresco (PAONESSA, 2004). Já a muçarela de búfala industrial, que é obtida a partir de leite pasteurizado e cultura láctica selecionada, pode manter uma vida útil prolongada até 20 dias, mas o sabor é completamente diferente da muçarela de búfala artesanal (LAURIENZO et al., 2008).

Dentre as etapas de processo de fabricação do queijo muçarela de búfala, o tempo de corte da coalhada é considerado uma etapa que afeta bastante o teor de umidade, a qualidade, as perdas de gorduras no soro e o rendimento da coalhada (HUSSAIN et al., 2012).

O rendimento, no entanto, é influenciado não só pelo tempo de corte, como também pelas temperaturas de coagulação, em que temperaturas mais elevadas dão origem a uma quantidade maior de soro de leite, quando comparadas com sinérese a baixas temperaturas de coagulação, as quais produzem coalhadas com rendimento inferior (HUSSAIN et al., 2012). Relatos de literatura, que afirmam que o leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados (queijo, iogurte, manteiga) que o leite bovino, sendo necessário aproximadamente 5 litros de leite de búfala para se produzir 1,0 kg de queijo muçarela (SILVA et al., 2003).

1.1.6 Proteólise

A proteólise consiste na degradação das proteínas por enzimas proteolíticas, principalmente as caseínas, da qual resultam peptídeos e/ou aminoácidos livres. O índice de concentração destes compostos pode variar e contribuir para o sabor básico do queijo (WALSTRA et al., 2006).

A proteólise é o mais complexo e, na maioria das vezes, o mais importante dos eventos bioquímicos primários que ocorrem na maior parte dos queijos, a qual interfere tanto no desenvolvimento da textura, via clivagem da caseína, quanto no sabor, pela formação dos precursores, que posteriormente vão sofrer conversão para compostos aromáticos voláteis (McSWEENEY, 2004; KONGO, 2009).

A relação entre os compostos derivados da proteólise varia muito a depender do tipo de queijo e essas diferenças são baseadas nos conceitos de extensão e profundidade que são utilizados no processo de maturação (WALSTRA et al., 2001).

A extensão expressa a proporção de moléculas de proteína que foi hidrolisada em peptídeos de alto e médio peso molecular, sendo um indicativo da proteólise primária, ocorrendo principalmente pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual, sobre a α_{s1} -caseína e, em menor escala, sobre a β -caseína (FOX, 1989; WALSTRA et al., 2001).

A extensão da proteólise varia de muito limitada (por exemplo, na muçarela) a muito grande (por exemplo, em variedades de queijos azuis) (FOX et al., 2000). Durante a maturação, a proteólise no queijo pode ser catalisada por enzimas do agente coagulante (por exemplo, quimosina, pepsina e proteases de origem microbiana), do leite (plasmina e, talvez, a catepsina D e de outras proteases de células somáticas), por enzimas da cultura iniciante e das não-iniciantes, ou por culturas secundárias (por exemplo, o *P. camemberti*, *P. roqueforti*,

Propionibacterium sp., dentre outros) e por proteases ou peptidases exógenas, ou ambas, que são utilizadas para acelerar o processo de maturação (SOUZA et al., 2001).

A profundidade é o grau em que estes peptídeos são degradados em componentes menores (aminoácidos) e está relacionado à presença de enzimas proteolíticas oriundas de micro-organismos que hidrolisam os peptídeos resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989; WALSTRA et al., 2001).

Considerando a complexidade da proteólise, uma variedade de métodos podem ser usados, dependendo da profundidade da informação necessária, e são classificados em específicos e não específicos (FOX et al., 2000).

Os métodos não específicos baseiam-se na determinação de nitrogênio solúvel ou extraível por uma série de solventes e/ou precipitantes, em que a concentração final é, posteriormente, quantificada por espectrofotometria ou titulação pelo método de Kjeldahl. Tais métodos são valiosos para avaliar a extensão total da proteólise e a contribuição geral de cada agente proteolítico. As técnicas são relativamente inespecíficas, simples e são importantes para a rotina de avaliação da maturação do queijo, já que o nitrogênio solúvel correlaciona-se bem com a idade e um menor grau, com a qualidade do queijo (FOX et al., 2000).

As técnicas específicas envolvem a utilização de cromatografia e/ou eletroforese, que identificam os peptídeos individualmente. Eles permitem o monitoramento da proteólise das caseínas individuais e identificação dos peptídeos formados (FOX et al., 2000). A proteólise primária pode ser eficazmente avaliada em eletroforese por ureia em gel de poliacrilamida (ureia-PAGE), Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE) e focagem isoeletrica, ao passo que a subsequente formação de peptídeos (denominados proteólise secundária), que é provocada por peptidases de origem microbiana, podem ser determinados por meio de cromatografia líquida em fase reversa de elevado desempenho (RP-HPLC), sendo que esta última técnica também permite o isolamento e identificação de uma vasta gama de peptídeos individuais (KONGO, 2009).

A técnica de eletroforese se baseia na migração das proteínas quando submetidas a um campo elétrico, onde as cargas positivas e negativas são atraídas para seus polos contrários correspondentes sendo possível sua separação e identificação, além de que sua carga, forma, tamanho e associação com outros íons podem alterar sua mobilidade (SILVA, 2002).

A migração de uma proteína em um gel durante a eletroforese se dá, portanto, em função de seu tamanho e sua forma. Um método eletroforético comumente empregado para a

estimativa de pureza e massa molar é o SDS-PAGE com o emprego do detergente Dodecilsulfato de Sódio (SDS). SDS vincula-se à maioria das proteínas em quantidades mais ou menos proporcionais a massa molar da proteína, sendo uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácidos. Assim, a eletroforese na presença de SDS separa as proteínas quase que exclusivamente com base na massa molar, com polipeptídeos menores migrando mais rapidamente. Essa técnica é realizada em géis constituídos de poliacrilamida, este gel atua como uma peneira molecular, retardando a migração das proteínas aproximadamente na proporção de sua carga. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada (WHITFORD, 2005).

Chaves et al. (1999), ao estudarem o efeito do tempo de congelamento lento e o tempo de têmpera (tempo sob refrigeração após descongelamento) sobre as características da muçarela produzida com fermento láctico mesofílico, avaliaram a proteólise durante o armazenamento do queijo cru, demonstrando por meio da eletroforese a hidrólise da α_{s1} -caseína, mostrando a atividade do coagulante durante o armazenamento refrigerado.

Alichanidis et al. (1981) estudaram a produção de queijo Feta e Teleme com leite misto de cabra e ovelha a partir de coalhada congelada (-20° C) e armazenada por 180 dias, acompanhando a decomposição das caseínas do queijo durante a maturação (5, 15, 30, 60 e 120) dias por meio da eletroforese. Estes autores relatam que após 120 dias de maturação observou-se perda de 83,75% da α_s - caseína no queijo de coalhada congelada, enquanto na coalhada fresca (controle) apenas 74,25% foi hidrolisada. Por sua vez, a β -caseína foi degradada no mesmo período de 28,33% em queijos obtidos a partir da coalhada congelada e 12,22% nos controles.

Trabalhos relatados por Yazici et al. (2010) confirmam a eficiência do uso da técnica do SDS-PAGE na determinação da proteólise da muçarela de búfala de acordo com valores de pH do soro.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a composição centesimal, características físicas, químicas, rendimento, capacidade de derretimento e índice proteolítico da muçarela de búfala estocada sob refrigeração.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Elaborar queijo muçarela de búfala com a coalhada fermentada fresca e com as coalhadas fermentadas e congeladas por diferentes períodos de armazenamento;
- Avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada sobre a composição centesimal (proteína, gordura, umidade, cinzas, extrato seco total), as características físicas (pH, componentes de cor), características químicas (acidez), rendimento, capacidade de derretimento e índice proteolítico da muçarela de búfala;
- Avaliar o efeito do tempo de estocagem sob refrigeração dos queijos obtidos a partir da coalhada congelada sobre a composição centesimal (proteína, gordura, umidade, cinzas, extrato seco total), as características físicas (pH, componentes de cor), características químicas (acidez), capacidade de derretimento e índice proteolítico da muçarela de búfala.

1.4 Referências

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; MARQUES, J.R.F.; CASTRO, S.T.R.; COSTA, M.R.; MARIANTE, A.S. Conservação e Caracterização de Búfalos no Brasil: uma revisão de literatura. – Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2006. 23 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110 ; 166).

ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, N.; TZANETAKIS, N.; VAFOPOULOU, A. Teleme Cheese from Deep-Frozen Curd. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 732-739, 1981.

AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos relacionados a búfala leiteira. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n.2, p.111-117, abril/jun, 2005a.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.106-110, abril/jun. 2005b.

ANDRADE, K.D.; RANGEL, A.H.N.; ARAÚJO, V.M.; LIMA JÚNIOR, D.M.; OLIVEIRA, N.A. Efeito da Estação do Ano na Qualidade do Leite de Búfalas. **Revista Verde**. v. 6, n. 3, p. 33-37, jul/set, 2011.

APONTE, M.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G. *Short communication*: Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.2358-2361, mar. 2010.

ARAÚJO, T.P.M.; RANGEL, A.H.N.; SOARES, A.D.; LIMA, T.C.C.; JUNIOR, D.M.L.; NOVAES, L.P. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. **Revista Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.07, n. 01, p. 01-05, 2011.

BASTIANETTO, E. Aspectos Econômicos da Criação de Bubalinos em Minas Gerais. In: II Simpósio Mineiro de Buiatria. Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gerais: Associação de Buiatria de Minas Gerais (ABMG), p. 1-14, 2005.

BRASIL. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela)**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção1.

BUZI, K.A.; PINTO, J.P.A.M.; RAMOS, P.R.R.; BIONDI, G.F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Revista Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 29 (1), p. 7-11, jan/mar. 2009.

CAMPINELE, G.; BERNARDES, O.; BASTIANETTO, E.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; VECCHIO, D. **Manejo de Búfalas Leiteiras**. Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, 2007.

CHAVES, W.H.; VIOTTO.; GROSSO, C.R.F. Proteolysis and Functional Properties of Mozzarella Cheese as Affected by Refrigerated Storage. **Journal of Food Science**, vol. 64, n. 2, p. 202-205, 1999.

CHEN, L.; LIU, H. Effect of emulsifying salts on the physicochemical properties of processed cheese made from mozzarella. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.4823-4830, mai, 2012.

COELHO, K.O.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L.D.; CORASSIN, C.H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.3, p.167-170, 2004.

COLLA, L.M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e Descongelamento: sua influência sobre os alimentos. **Revista Veter**, Rio Grande, v.13, p.53-66, 2003.

CORREIA, L.F.M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alimentação e nutrição**, Araraquara, v.19, n.1, p.83-95, 2008.

COSTABEL, L.; PAULLETTI, M.S.; HYNES, E. Proteolysis in Mozzarella Cheeses Manufactured by Different Industrial Processes. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.2103-2112, 2007.

CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA C.A.F.; HOTTA, R.M.; SOBRAL, P.J.A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p.448-453, jun/set. 2005.

DAMÉ, M.C.F. Búfalo: animal de tração. **Embrapa Clima Temperado**. Documentos 173. Pelotas, 2006. 1º edição, p. 1-24. Disponível em: www.cpact.embrapa.br. Acesso em: 03 de setembro de 2012.

FERNANDES, S.A. de A.; MATTOS, W.R.S.; MATARAZZO, S.M.; GAMA, M.A.S.; MALHADO, C.H.M.; FERRÃO, S.P.B. ETCHEGARAY, M. A. L. LIMA, C. G. Effect of Somatic Cell Count on Murrah buffaloes Milk. **Proceedings 9th World Buffalo Congress**, Buenos Aires, p. 552-553, abril, 2010.

FIGUEIREDO, E.L.; JUNIOR, J.B.L.; TORO, M.J.U. Caracterização Físico-Química e Microbiológica do Leite de Búfala “in natura” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 04, n.1, p.19-28, 2010.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 175p

FOX, P.F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n.6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, Aspen, p.587, 2000.

GANESAN, B.; IRISH, D.A.; BROTHERSEN, C.; McMAHON, D.J.; Evaluation of microbial survival post-incidence on fresh Mozzarella cheese. **Journal Dairy Science**, v.95, p.6891-6896, 2012.

HUSSAIN, I.; GRANDISON, A.; BELL, A. Rheology of rennet induced curd made from buffalo milk. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.22, p.324-328, 2012b.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Prod. Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.39, p.1-63, 2011.

LAURIENZO, P.; MALINCONICO, M.; MAZZARELLA, G.; PETITTO, F.; PICIOCCHI, N.; STEFANILE, R.; VOLPE, M.G. Water Buffalo Mozzarella Cheese Stored in Polysaccharide-Based Gels: Correlation Between Prolongation of the Shelf-Life and Physicochemical Parameters. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1317-1324, 2008.

KATIKI, L.M.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Aspectos físico-químicos e microbianos do queijo maturado por mofo obtido da coagulação mista com leite de cabra congelado e coalhada congelada. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.740-743, out/dez. 2006.

KONGO, J.M.; GOMES, A.; MALCATA, F.X.; McSWEENEY, P.L.H. Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of Sao Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). **Food Chemistry** v.112, p.131–138, 2009.

McMAHON, D.J.; PAULSON, B.; OBERG, C. J. Influence of Calcium, pH, and Moisture on Protein Matrix Structure and Functionality in Direct-Acidified Nonfat Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.3754–3763, 2005.

McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**. v.57, n.2/3, p.127-144, 2004.

MESQUITA, A.J; TANEZINI, C.A.; FONTES, I.F.; PONTES, I.S.; ROCHA. J. de M.; SOUZA, J.T.; D’ALESSANDRO, W.T. **Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino**. Goiânia: UFGO, 2001. 77 p.

NADAL, E.S. Congelacion de Cuajadas de Leche de Oveja. **Tese (Doutorado)** – Departamento de Patologia e Produtos Animais, Universidade Autônoma de Barcelona, Bellaterra, 1995.

MONTEIRO, A.A.; PIRES, A.C. dos S.; ARAÚJO, E.A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite**. Viçosa: UFV, 81p, 2007.

OLIVEIRA, A.L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005.

PAONESSA, A. Influence of the preservation liquid of Mozzarella di Bufala Campana D.O.P. on some aspects of its preservation. **Bubalus Bubalis** v.IV, p.30–36, 2004.

PEREIRA, R.G.A.; TOWNSEND, C.R.; COSTA, N.L.; MAGALHÃES, J.A. **Eficiência Reprodutiva de Búfalos**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007. 15 p. – (Documentos/ Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865; 123).

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Revista Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

ROSA, B.R.T.; FERREIRA, M.M.G.; AVANTE, M.L.; FILHO, D.Z.; MARTINS, I.S. Introdução de Búfalos no Brasil e sua Aptidão Leiteira. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.4, n.8, 2007.

SAMEEN, A.; ANJUM, F.M.; HUMA, N.; KOUSAR, R.; NAWAZ, H. Impact of Fat Levels in Milk on the Composition, Sensory Attributes and Functionality of Buffalo Mozzarella Cheese. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v.45, n.4, 2008.

SILVA, L.C. Processamento de alimentos. Porto Alegre: Universidade Federal, Centro de Ciências Agrárias, 2006. Disponível em: http://www.agais.com/sa0106_processamento_de_alimentos.pdf. Acesso em: 22 jul. 2013.

SILVA, M.S.T.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; GONÇALVES, I.A.; MIRANDA, H.A.; ERCHSEN, R.; FONSECA, R.F.S.R.; MELO, J.A.; COSTA, J.M. PRONAF – Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores. CPATU: Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2003.

SILVA, C.L.S.P. Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações. **Ciências Agrárias e Saúde**, v.2, n.1, p.74-8, 2002.

SOUZA, M.J.; ARDO, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v.11, p.327-345, 2001.

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

VERRUMA, M.R.; SALGADO J.M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, p.131-137, jan/abril, 1994.

VIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C.S.; KUABARA, M.Y.; OLIVEIRA, D.A.A. Bubalinocultura no Brasil – Short communication. **PUBVET**, Londrina, v.5, n.2, Ed.149, Art.1003, 2011.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**. CRC, Second Edition, USA, 2006.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Ciencia de La Leche y Tecnología de los Productos Lácteos**. España, Editorial Acribia, 2001.

WHITFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Siurthern Gate, Chichester, England. 511p, 2005.

YAZICI, F.; DERVISOGLU, M.; AKGUN, A.; AYDEMIR, O. Effect of whey pH at drainage on physicochemical, biochemical, microbiological, and sensory properties of mozzarella cheese made from buffalo milk during refrigerated storage. **Journal of Dairy Sciences**, v.93, p.5010-5019, 2010.

YONKERS, B. Market Update: World Dairy Situation 2011. **International Dairy Foods Association**. Disponível em: <http://www.idfa.org/news--views/details/6664/>. Acesso em: 20 de dezembro de 2013.

**CAPÍTULO 2 – EFEITO DO TEMPO DE CONGELAMENTO DA COALHADA
FERMENTADA DE LEITE DE BÚFALA SOBRE A QUALIDADE NUTRICIONAL
DO QUEIJO MUÇARELA DE BÚFALA ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO**

Resumo – Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a composição centesimal, rendimento, características físicas e químicas da muçarela de búfala. Os tratamentos foram compostos por tempos de congelamento da coalhada fermentada (0, 40, 80, 120 e 160 dias) de leite de búfala e tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala (10, 20 e 30 dias). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5 x 3 e os resultados obtidos foram analisados por meio de análise de regressão ($\alpha = 0,05$). Com relação aos diferentes tempos de refrigeração do queijo muçarela não foi verificado diferença significativa para a composição centesimal e pH, entretanto foi observado um efeito significativo com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada. Para o parâmetro acidez houve interação dos tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala com os tempos de estocagem sob refrigeração dos queijos. Pode-se concluir que a utilização de coalhada congelada de leite de búfala na fabricação de queijos muçarela pode ser uma alternativa viável para superar a escassez sazonal do leite de búfala.

Palavras-chave: Sazonalidade, composição, cor, queijo refrigerado.

Abstract – The objective of this study was to evaluate the effect of the freezing weather curd fermented buffalo milk on the proximate composition, yield, physical and chemical characteristics of buffalo mozzarella. The treatments consisted of freezing times of curd fermented (0, 40, 80, 120 and 160 days) of buffalo milk and times chilling buffalo mozzarella cheese (10, 20 and 30 days). The experiment was conducted in 5 x 3 factorial scheme and the results were analyzed by regression analysis ($\alpha = 0.05$). With respect to the different times of cooling mozzarella cheese significant difference was not observed for proximate composition and pH, however a significant effect with respect to the times of freezing the fermented curd was observed. For the acidity parameter was no interaction of time freezing the fermented buffalo milk curd with storage time under refrigeration cheeses. It can be concluded that the use of frozen curd buffalo milk in the manufacture of mozzarella cheese can be a viable alternative to overcome seasonal shortages of buffalo milk.

Keywords: Seasonality, composition, color, refrigerated cheese.

2.1 INTRODUÇÃO

A muçarela é um queijo fresco de massa filada originado na Itália. O nome massa filada refere-se ao tratamento exclusivo de plasticização e texturização da coalhada fresca em água quente que dá ao queijo acabado sua estrutura fibrosa característica e propriedades de derretimento (AHMED et al., 2011). Este queijo caracteriza-se por apresentar alto teor de umidade (55 a 62%), alto teor de gordura no extrato seco (>45%), textura suave, sabor agradável e levemente ácido (APONTE et al., 2010). Possui aparência fibrosa devido à formação de fibras de proteínas durante o processo de filagem (McMAHON et al., 2005) e cor esbranquiçada, a qual está intimamente ligada não só a gordura do leite, como também ao tamanho dos glóbulos de gordura dispersos na matriz proteica (PERRY, 2004; CHEN & LIU, 2012).

A qualidade e aceitação do queijo muçarela pelos consumidores é determinada pelo teor de umidade, percentual de gordura, minerais especialmente o cálcio, pH e proteólise, fatores estes, que ditam as propriedades tecnológicas resultantes deste queijo (SAMEEN et al., 2008). A cor é outro importante parâmetro utilizado para avaliar a qualidade de queijos, sendo considerada pelos consumidores no momento da decisão de compra (KUBO et al., 2013).

Quase toda produção de leite de búfala no Brasil é convertida em derivados lácteos, principalmente queijo muçarela e uma das razões para sua alta demanda é o fato de que este queijo pode ser apreciado in natura ou como ingrediente para pizza (MUCCHETTI & NEVIANI, 2006; ARAÚJO et al., 2012). No entanto, o caráter sazonal da produção de leite de búfala interfere de maneira negativa na oferta e comercialização deste produto em determinadas épocas do ano.

Nesse sentido, o uso do congelamento tem sido uma alternativa estudada para superar a sazonalidade e os seus efeitos sobre a produção em diferentes tipos de queijos e coalhadas, tais como, coalhada congelada de leite de cabra (Picon et al., 2013), coalhada congelada de leite de ovelha (Picon et al., 2010), queijos macios com leite de cabra (Van Hekken et al., 2005), queijo Porto Salut Argentino (Verdini et al., 2004), queijos Los Pedroches (Tejada et al., 2002) e queijo Muçarela (Chaves et al., 1999).

Em estudos realizados por Barrucand & Raynal-Ljutovac (2011) foi verificado que a utilização de coalhada congelada de leite de cabra provoca mudanças no nível de lipólise e mobilidade da gordura e estes fenômenos são por vezes associados ao aumento na exsudação da gordura. No entanto, estudos realizados por Picon et al. (2010) em queijo Hispánico utilizando coalhada congelada de leite de ovelha por diferentes tempos, concluíram que a

utilização de coalhada congelada na fabricação de queijos não altera suas características e pode servir para superar a escassez sazonal deste leite.

O congelamento de queijos ou coalhada para ajustar a oferta de derivados lácteos em determinadas épocas do ano tem sido estudado exaustivamente com leite de cabra e ovelha, no entanto há uma carência de estudos realizados com queijos ou coalhada de leite de búfala, espécie esta, que assim como as cabras e ovelhas, também apresentam déficit na oferta do leite em determinadas épocas do ano.

Pesquisas relatam que embora o congelamento seja uma alternativa eficaz em prolongar a vida de prateleira e a disponibilidade de alimentos, o congelamento do queijo tem sido evitado devido às alterações nas características reológicas, texturais e tecnológicas causadas pelos cristais de gelo (VAN HEKKEN et al., 2005; KUO & GUNASEKARAN, 2009). Sendo assim, a alternativa tradicionalmente considerada mais adequada para regulação do mercado de queijo muçarela no período de entressafra é o congelamento da coalhada, tornando-se imprescindível estudos sobre a qualidade do queijo muçarela processado a partir da coalhada congelada de leite de búfala, visto que esta técnica foi realizada satisfatoriamente utilizando o congelamento da coalhada de leite de outras espécies.

Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a composição centesimal, características físico-químicas, rendimento e cor da muçarela de búfala estocada sob refrigeração.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Obtenção da Matéria-Prima

As amostras de leite de búfala foram coletadas nos meses de setembro, outubro e novembro de 2012, no período da manhã, em uma fazenda localizada no Município de Maiquinique – BA, sob o sistema de ordenha manual e em condições de ordenha higiênica, de fêmeas bubalinas mestiças Jafarabadi x Murrah, alimentadas a pasto (*Brachiaria decumbens*), no período final da lactação.

2.2.2 Processamento dos queijos

O experimento foi conduzido em um Laticínio situado na cidade de Itapetinga – Ba no período de setembro de 2012 a maio de 2013. O volume de leite utilizado para cada repetição

variou entre 70 e 100 litros, com padronização em aproximadamente 4,0% de gordura. Para obtenção das coalhadas fermentadas, o leite foi pasteurizado a 65° C/30 minutos, seguido de resfriamento até a temperatura de 35° C. Em seguida, foi feita a adição dos ingredientes, utilizou-se 1,0 g de cultura láctica mesofílica, liofilizada (Fermento DVS-R704 *Chr Hansen*) constituída pelas espécies *Lactococcus Lactis* subespécie *Cremoris* e *Lactococcus Lactis* subespécie *lactis*, dissolvidos em 250 mL de leite de búfala, 5,0 mL de cloreto de cálcio a 50% e 9,0 mL de coalho (coagulante líquido HÁ-LA® do Brasil - *Chr Hansen* – força 1:3.000). Após repouso de 30 minutos ocorreu à formação do coágulo (massa), que foi cortado (cerca de 1,0 cm de aresta) no sentido vertical e depois horizontal com um auxílio de uma lira. Procedeu-se lentamente a primeira mexedura da massa durante 15 minutos sem aquecimento e depois uma segunda mexedura da massa a 42° C, até se obter uma massa cozida e firme. Foi realizada a dessoragem (retirada do soro) e a coalhada ficou fermentando por um período de aproximadamente 18 horas. Após a obtenção das massas fermentadas, as mesmas foram divididas em cinco blocos de massa aproximadamente iguais, sendo uma delas filada no mesmo dia (controle) e as demais transportadas até o laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde foram congeladas a -20° C até o momento do descongelamento preconizado para cada tratamento para elaboração dos queijos: T1 – sem congelamento da coalhada fermentada (controle); T2 – coalhada fermentada congelada por 40 dias; T3 – coalhada fermentada congelada por 80 dias; T4 – coalhada fermentada congelada por 120 dias; e T5 – coalhada fermentada congelada por 160 dias.

2.2.3 Filagem da massa

As massas congeladas, após descongeladas em seus respectivos tempos e a massa do tratamento controle (massa fresca), foram fatiadas, filadas em água aquecida a 80° C, acondicionadas em formas próprias para muçarela, sendo viradas de 10 em 10 minutos durante 40 minutos. Em seguida os queijos foram colocados em salmoura 20% (m/v) por cerca de uma hora. Após esse período foram retirados da salmoura para posterior secagem sob refrigeração, durante doze horas, sendo embalados a vácuo para posterior análise. Estes, foram estocados sob refrigeração sendo analisados com 10, 20 e 30 dias.

2.2.4 Análises do Queijo Muçarela

2.2.4.1 Composição centesimal

Para a composição centesimal do queijo muçarela determinou-se, em triplicata, os percentuais de umidade pelo método gravimétrico em estufa a 105° C e teor de cinzas em mufla a 550° C. O percentual de gordura foi realizado pelo método Gerber, o teor de nitrogênio total (NT) pelo método Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão de 6,38 para o cálculo da proteína total. As análises foram realizadas segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985). O EST estimado pela diferença entre o EST e percentual de umidade.

2.2.4.2 Análises Físico-químicas

2.2.4.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada por meio de pHmetro modelo QUIMIS, calibrado com soluções tampões pH 4,0 e pH 7,0 de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.2.4.2.2 Determinação da Acidez

A determinação da acidez titulável foi obtida por meio do cálculo do percentual de ácido láctico na amostra pela titulação com NaOH 0,1% de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.2.4.3 Determinação da Cor

A determinação da cor instrumental foi avaliada, em triplicata, em colorímetro modelo Colorquest XE (HunterLab) conectado a um computador provido de sistemas software universal, previamente calibrado em uma superfície branca e preta. Utilizou-se o sistema CIE L*a*b* (CIE, 1996), por meio da qual foram medidas as coordenadas: L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade), medidos no próprio aparelho.

Por meio da escala CIELAB, foram obtidas matematicamente a cor numericamente descrita em saturação, conforme equação (1) e tonalidade, conforme equação (2) (KUBO et al., 2013).

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (1)$$

$$h = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (2)$$

2.2.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial 5x3, sendo cinco tratamentos (0, 40, 80, 120 e 160 dias de congelamento da coalhada fermentada) e três tempos de refrigeração do queijo processado (10, 20 e 30 dias de armazenamento sob refrigeração). A coalhada fermentada fresca (tempo 0) foi o tratamento controle.

Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010). Os resultados obtidos nas análises laboratoriais foram submetidos à análise de regressão, considerando-se como fonte de variação os tempos de congelamento, os tempos de refrigeração e a interação dos fatores tempos de congelamento e tempos de refrigeração, testados a 5% de significância.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Composição Centesimal

As médias, equações de regressão ajustadas, coeficientes de variação e coeficientes de determinação para a composição centesimal (umidade, cinzas, gordura, proteína e EST) do queijo muçarela de búfala processados a partir da coalhada fresca e congelada observados (Tabela 1) revelaram que não houve interação ($P>0,05$) entre os tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala e os tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala para os parâmetros avaliados.

Com relação aos diferentes tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala não foi verificada diferença significativa ($P>0,05$) para a composição centesimal. Entretanto, foi observado um efeito significativo ($P<0,05$) com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada estudados sobre a composição centesimal da muçarela de búfala.

Tabela 1. Médias, equações de regressão ajustadas, coeficientes de variação e coeficientes de determinação (R^2) para a composição do queijo muçarela de búfala de acordo com diferentes tempos de congelamento da coalhada fermentada.

Parâmetros (%)	Tempos de Congelamento (dias)					CV (%)	Equação estimada	R^2
	0	40	80	120	160			
Teor de água	55,65	53,66	52,52	55,10	55,35	4,30	$\hat{Y} = 0,0004C^2 - 0,06C + 55,46$	0,75
Cinzas	5,36	6,33	6,85	6,64	6,30	7,85	$\hat{Y} = 0,0002C^2 + 0,03C + 5,40$	0,96
Gordura	63,58	57,79	51,01	52,81	56,90	8,27	$\hat{Y} = 0,0013C^2 - 0,25C + 64,14$	0,95
Proteína	19,47	19,80	20,10	21,32	21,83	7,80	$\hat{Y} = 0,004C + 19,95$	0,81
EST	44,45	46,42	47,54	44,87	44,65	5,03	$\hat{Y} = 0,0004C^2 + 0,06C + 44,65$	0,76

Observou-se efeito ($P < 0,05$) quadrático entre os tratamentos (tempos de congelamento) avaliados para o parâmetro teor de água. Os queijos obtidos das coalhadas congeladas tiveram um menor teor de umidade, quando comparados com os queijos obtidos por meio da coalhada fresca. Este fato pode ocorrer, provavelmente, por mudanças na molécula de caseína durante o congelamento da coalhada, o que leva à redução na capacidade de retenção de água da micela, produzindo, desta forma, queijos com menor umidade (KATIKI, 2006).

Segundo Sameen et al. (2008), a gordura facilita a retenção de água no queijo, este fato foi observado no presente trabalho, em que a diminuição no teor de gordura ocasionou um menor teor de água nos queijos obtidos a partir da coalhada congelada. No entanto, mesmo com diminuição do teor de água ao longo do tempo de congelamento da coalhada fermentada, estes foram classificados em queijos de alta e muito alta umidade estando de acordo com o estabelecido pela legislação vigente, que indica teores máximos de 60% (m/m) para queijo muçarela (BRASIL, 1997). A muçarela típica de leite de búfala possui em torno de 57% (m/m) de água, e esta alta umidade garante propriedades sensoriais como elevada maciez (MARINO, 2010).

Com a redução da umidade houve um aumento na concentração dos demais componentes (proteína, cinzas e EST), comportamento esperado tendo em vista a concentração dos constituintes do queijo. Para a análise de cinzas dos queijos observou-se

uma influência ($P < 0,05$) dos diferentes tempos de congelamento da massa, com efeito quadrático.

Houve um aumento do teor de cinzas com o aumento do tempo de congelamento das coalhadas fermentadas congeladas do leite de búfala, comportamento semelhante ao observado por Katiki (2006) ao estudar os aspectos químicos de queijo produzido com leite de cabra utilizando coalhada dessorada e congelada. Segundo McMahon et al. (2005), a presença de minerais leva a fortes interações proteína-proteína no interior da matriz do queijo, ocorrendo sinérese e desta forma levando a exclusão da água da matriz dos queijos durante o processamento, o que explica a diminuição no teor de água com o aumento no teor de cinzas no presente trabalho.

Após o congelamento, houve alterações significativas no teor de gordura, quando comparado com queijos processados a partir da massa fresca, o qual apresentou um máximo de 63,39% no queijo produzido com a massa fresca e um mínimo de 48,03% na massa congelada por 80 dias. Entretanto, os valores obtidos atenderam a especificação mínima da legislação vigente que é de 35% para GES (BRASIL, 1997).

A diminuição do teor de gordura pode estar associada à ruptura da membrana lipoproteica do glóbulo de gordura que teria ocorrido em função do processo de congelamento da coalhada fermentada. Segundo Lee et al. (1981), durante a coagulação do leite as proteínas tendem a se hidratar, e isso facilita a perda de gordura, uma vez que a água tende a ocupar o espaço a ser preenchido pela gordura. Sendo assim, alterações causadas na membrana da gordura durante o ciclo de congelamento e descongelamento podem ter dificultado a incorporação da gordura na matriz proteica durante o processo de plasticização, sendo perdida na água de filagem.

Foi observado um efeito significativo ($P < 0,05$) linear crescente do parâmetro proteínas em relação aos tempos de congelamento. Este aumento pode ser explicado também pela redução no teor de umidade, havendo uma concentração das proteínas.

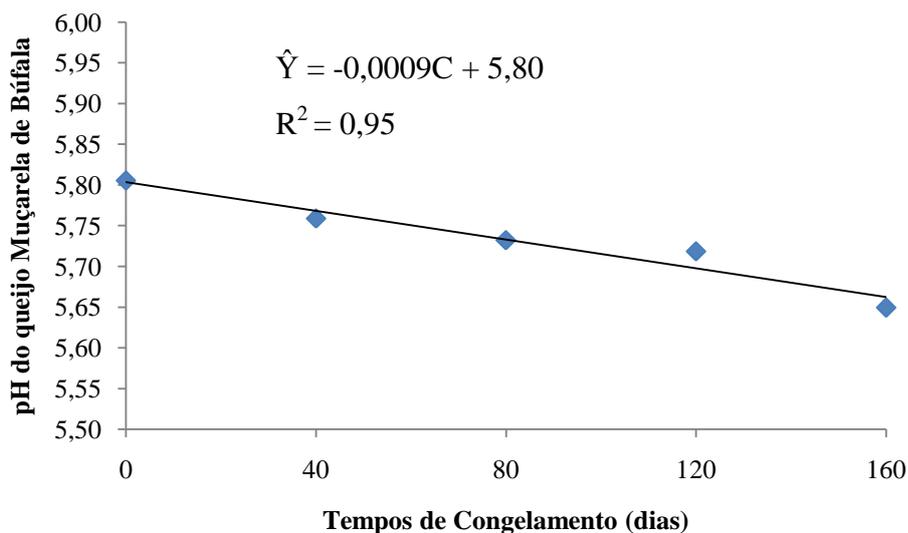
Houve efeito significativo ($P < 0,05$) quadrático em relação ao teor de EST. O aumento no teor de extrato seco total (EST) está associado à diminuição do teor de água, concentrando os demais componentes.

2.3.2 Análises Físico-químicas

Para o parâmetro pH não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) com relação aos diferentes tempos de refrigeração em que foram estocados os queijos. Entretanto, foi

observado um efeito significativo ($P < 0,05$) com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada (Figura 1). Houve um decréscimo linear do pH do queijo muçarela de búfala em função dos tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala.

Figura 1. Comportamento do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre pH dos queijos Muçarela de Búfala.



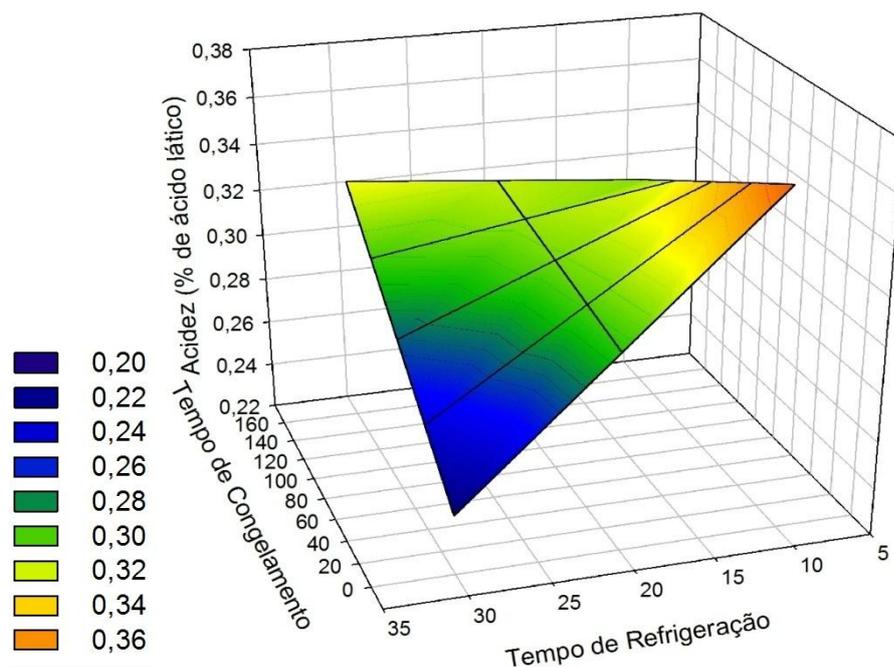
O decréscimo do pH no decorrer do tempo de congelamento pode estar associado à degradação da lactose pela ação de bactérias lácticas, levando à formação de ácido lático. Visto que a coalhada estava congelada a taxa das reações é menor, sendo assim, o valor de pH apresentou ligeira diminuição, variando entre 5,81 a 5,65.

Segundo McMahon et al. (2005), o pH influencia nas propriedades tecnológicas do queijo, onde valores de pH abaixo de 5,0 causa perda da solubilidade das caseínas e os queijos perdem a capacidade de derretimento e elasticidade. Sendo assim, os valores de pH encontrados no presente trabalho foram satisfatórios, visto que os valores de pH encontrados estavam acima 5,0, apresentando aumento na capacidade de derretimento durante a estocagem refrigerada.

O parâmetro pH é importante para identidade e qualidade de todos os queijos, pois altera as interações químicas entre os componentes estruturais (proteína, água e minerais), afetando diretamente a estrutura dos queijos (PASTORINO et al., 2003). Além disso, a redução do pH também contribui para a segurança do produto, uma vez que inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis.

Para o parâmetro acidez, houve interação ($P < 0,05$) dos tempos de estocagem sob refrigeração dos queijos com os tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala (Figura 2).

Figura 2. Superfície de resposta do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre o parâmetro acidez do queijo muçarela de búfala estocado em diferentes tempos de refrigeração.

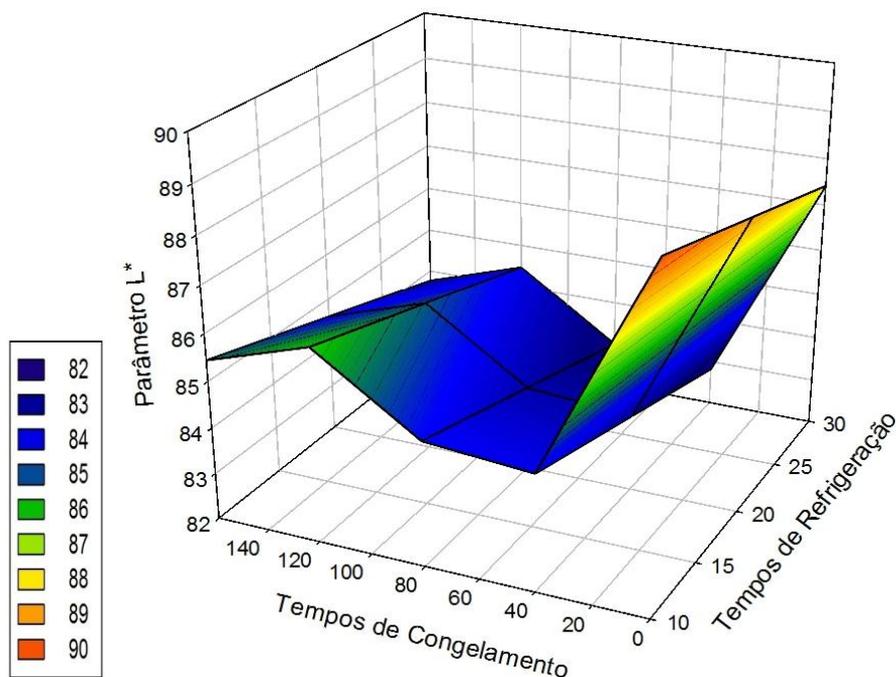


Por meio da análise de superfície, observou-se que à medida que se aumenta o tempo de congelamento da massa há aumento na acidez e à medida que avança o tempo de estocagem dos queijos sob refrigeração, há uma diminuição da porcentagem de acidez dos queijos. Nos queijos elaborados com a massa fresca o teor de acidez aos 10 dias de estocagem do queijo sob refrigeração foi de 0,33% de ácido láctico, enquanto que aos 30 dias de refrigeração esse teor diminuiu para 0,22% de ácido láctico. Por sua vez, aos 40 dias de congelamento da massa, observa-se aumento no teor de acidez aos 10 dias de refrigeração (0,35% de ácido láctico) quando comparados com os queijos obtidos da massa fresca, no mesmo tempo de refrigeração. Este fato correlaciona-se com o aumento nos valores de pH com o tempo de estocagem da massa congelada.

2.3.3 Análise de Cor

O parâmetro luminosidade (L^*) foi afetado pelos tempos de estocagem da coalhada congelada e pelos dos tempos de estocagem sob refrigeração dos queijos (Figura 3).

Figura 3. Superfície de resposta do efeito dos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre o parâmetro Luminosidade (L^*) do queijo muçarela de búfala estocado em diferentes tempos de refrigeração.



Por meio da análise de superfície observou-se que o parâmetro luminosidade (L^*) diminuiu com o tempo de congelamento da coalhada fermentada e com o tempo de estocagem dos queijos sob refrigeração (Figura 3), indicando que durante o tempo de estocagem a intensidade do escurecimento aumentou. Segundo Dias (2009), a luminosidade (value) caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se as cores são claras ou escuras, variando de preto a branco. García-Pérez et al. (2005), afirmam que, valores baixos de L^* são causados pelo maior teor de constituintes no produto como proteína, favorecendo a redução de água livre em função do aumento de sólidos totais, resultando em menor reflexão de luz, diminuindo a tendência ao branco, cor característica do leite e queijo de búfala. Este fato foi percebido no presente trabalho, onde houve um aumento linear no teor de proteínas e sólidos totais e diminuição no teor de umidade.

As médias, equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação para os parâmetros de cromaticidade a^* e b^* e saturação C^* do queijo muçarela de búfala obtidos a partir da coalhada fermentada congelada observados (Tabela 2) revelaram que não houve

interação ($P > 0,05$) entre os tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala e os tempos de congelamento da coalhada fermentada do leite de búfala para os parâmetros avaliados.

Com relação aos diferentes tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) parâmetros de cromaticidade a^* e b^* e saturação C^* . Entretanto, foi observado um efeito significativo ($P < 0,05$) com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada estudados sobre a estes parâmetros.

Tabela 2. Médias, equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação (R^2) para os parâmetros de cromaticidade a^* e b^* e saturação C^* do queijo muçarela de búfala obtidos a partir da coalhada fresca e congelada.

Parâmetros	Tempos de Congelamento					Equação estimada	R^2
	0	40	80	120	160		
a^*	-2,85	-3,44	-3,62	-3,29	-3,38	$-1,1 \times 10^{-6}C^3 + 0,00033C^2 - 0,03C - 2,84$	0,88
b^*	18,58	20,77	19,45	20,28	20,36	$0,0077C + 19,27$	0,76
C^*	18,72	20,97	19,79	20,37	20,66	$4 \times 10^{-6} - 0,0011C^2 + 0,08C + 18,86$	0,73

A coordenada de cromaticidade a^* aponta a coloração no intervalo de verde ($a^* < 0$) a vermelho ($a^* > 0$). Observou-se que com o decorrer do tempo de congelamento da coalhada, houve uma diminuição do valor de a^* , que representa a intensidade da cor verde. Segundo Van Dender (1989) o precipitado esverdeado é produzido pelo pigmento biliverdina que por meio da ação de ácido e calor, precipita junto com as proteínas, resultando num produto esverdeado. Tal pigmento é reduzido a bilirrubina, de cor amarela, durante a estocagem. Este fato corrobora com o presente trabalho, onde foi observada a cor da muçarela de búfala tendendo ao verde e com o decorrer do tempo de estocagem apresentou tendência à cor amarela.

Segundo Cortez et al. (1999) a diminuição do índice a^* na muçarela é devido à ação da cultura láctica durante a estocagem, que age metabolizando a lactose e dessa forma diminuindo o substrato para a reação de escurecimento, já que a lactose também faz parte das reações de escurecimento.

A coordenada de cromaticidade b^* aponta a coloração no intervalo de azul ($b^* < 0$) ao amarelo ($b^* > 0$). Pode-se observar um comportamento linear crescente na coordenada de cromaticidade b^* com o tempo congelamento da coalhada fermentada. Para os queijos fabricados com a massa fresca, os valores de b^* apresentaram os menores índices, tornando as amostras mais claras que as demais. Esta tendência ao amarelo apresentada no decorrer do

período de estocagem da coalhada congelada, pode ser devido ao aumento da proteólise das caseínas.

Observou-se aumento nos índices de saturação C^* com o decorrer do tempo de congelamento da coalhada fermentada. Este fato ocorreu provavelmente devido a um aumento da coordenada de cromaticidade b^* que apresentou um comportamento tendendo ao amarelo e do parâmetro luminosidade L^* que evidenciou aumento nos índices de escurecimento, contatando aumento nos índices de saturação. Este aumento nos índices de saturação pode ter ocorrido também em função da diminuição do teor de umidade, concentrando os constituintes, havendo menor reflexão da luz.

Conforme pode ser observado na Tabela 3, não houve efeito significativo ($P < 0,05$) para o parâmetro tonalidade h , com relação aos tempos de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala e tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração. A tonalidade (hue) é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor, permitindo diferenciá-la, e está associada a certo comprimento de onda do espectro visível (DIAS, 2009). Dessa forma, conclui-se que a tonalidade dos queijos não se alterou, apresentando aumento na saturação ao longo do tempo de estocagem, em que os queijos se apresentaram com uma coloração mais intensa, provavelmente devido a perda de umidade.

Tabela 3. Médias do parâmetro tonalidade h do queijo muçarela de búfala de acordo com diferentes tempos de congelamento da coalhada fermentada.

Tonalidade	Tempos de Congelamento (dias)					Tempo de Refrigeração (dias)	Equação Estimada
	0	40	80	120	160		
h	-79,72	-80,64	-79,19	-81,02	-79,50	10	$\hat{Y} = -80,01$
	-81,96	-81,23	-79,56	-81,23	-81,35	20	$\hat{Y} = -81,06$
	-80,43	-80,12	-79,33	-80,45	-80,61	30	$\hat{Y} = 80,19$

2.4 Conclusão

O congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala influenciou na composição centesimal da muçarela de búfala, diminuindo sua capacidade de retenção de água, pH e gordura, porém, aumentou os teores de proteína. A interação do tempo de congelamento da coalhada fermentada e estocagem dos queijos sob refrigeração influenciou apenas na acidez e no parâmetro luminosidade dos queijos, apresentando aumento da acidez com o tempo de congelamento da coalhada e diminuição da acidez dos queijos com o tempo de estocagem

sob refrigeração e quanto a luminosidade, apresentou aumento na intensidade de escurecimento. O uso de coalhada congelada de leite de búfala provou ser um procedimento viável para superar a baixa produção de leite de búfala em alguns períodos no ano, já que as características dos queijos não foram substancialmente afetadas. No entanto, um estudo adicional das características sensoriais e microbiológicas se faz necessário para determinar se essas alterações na composição, propriedades físico-químicas e cor são detectadas pelo consumidor.

2.5 Referências

AHMED, N.S.; ABD EL-GAWAD, M.A.M.; EL-ABD, M.M.; ABD-RABOU, N.S. Properties of Buffalo Mozzarella Cheese as Affected by Type of Coagulant. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**. v.10, n.3 p.339-357, 2011.

ANDRADE, K.D.; RANGEL, A.H.N.; ARAÚJO, V.M.; LIMA JÚNIOR, D.M.; OLIVEIRA, N. A. Efeito da Estação do Ano na Qualidade do Leite de Búfalas. **Revista Verde**. v. 6, n. 3, p. 33-37, jul/set. 2011.

APONTE, M.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G. *Short communication*: Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**. v.93, p.2358-2361, mar. 2010.

ARAÚJO, K.B.S.; RANGEL, A.H.N.; FONSECA, F.C.E.; AGUIAR, E.M.; SIMPLÍCIO, A.A.; NOVAES, L.P.; JÚNIOR, D.M.L. Influence of the year and calving season on production, composition and mozzarella cheese yield of water buffalo in the State of Rio Grande Do Norte, Brazil. **Italian Journal of Animal Science**. v.11, n.16, p.87-91, Jan, 2012.

BARBOSA, M. Goat's milk research in Portugal. **Lait**, v.73, n.5-6, p.425-429, 1993.

BARRUCAND, P.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Relationship Between Technological Steps and Behaviour of French Goat Cheeses for Culinary Applications. International Dairy Federation, Special Issue. n.1201, p.54-65, mai. 2011.

BRASIL. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1.

CHAVES, W.H.; VIOTTO; GROSSO, C.R.F. Proteolysis and Functional Properties of Mozzarella Cheese as Affected by Refrigerated Storage. **Journal of Food Science**, v.64, n.2, p.202-205, 1999.

CHEN, L.; LIU, H. Effect of emulsifying salts on the physicochemical properties of processed cheese made from mozzarella. **Journal of Dairy Science**. v.95, p.4823-4830, mai, 2012.

CORTEZ, M.A.S.; FURTADO, M.M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; MARTINS, J.M. Métodos de Avaliação da Qualidade das Propriedades Funcionais de Queijo Mussarela. **Revista Laticínio Cândido Tostes**, v.54, n.309, p.17-20, jul/ago,1999.

DIAS, M.M.S. **Leite de Cabra Fermentado Adicionado de Prebiótico, Probióticos e Compostos Bioativos Destinados a Idosos**. 2009. 123p. Dissertação (mestrado), Programa de Pós Graduação da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

FOX, P.F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.6, p.1379-1400, 1989.

GARCÍA-PÉREZ, F.J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS, E.; PÉREZALVAREZ, J.A.; SENDRA, E. Effect of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. **Industrial Applications**, v.30, n.6, p.457-463, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.232.

LEE, S.H.; MARSHALL, R.T. Microstructure and texture of processed chesse, milk curds, and caseinate curds containing native or boiled soy proteins. **Journal Dairy Science**. Champaing, v 64, n.12, p.231-2317, dez, 1981.

KATIKI, L.M.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Aspectos físico-químicos e microbianos do queijo maturado por mofo obtido da coagulação mista com leite de cabra congelado e coalhada congelada. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.740-743, out/dez. 2006.

KUBO, M.T.K.; MAUS, D.; XAVIER, A.A.O.; MERCANDANTE, A.Z.; VIOTTO, W.H. Transference of lutein during cheese making, color stability, and sensory acceptance of Prato cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.33, n.1, p.81-88, fev.2013.

KUO, M.; GUNASEKARAN, S. Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. **Food Science and Technology**. v.42, p.9-16, jul. 2009.

MARINO, A.L.F.; BORGES, M.T.M.R.; BRUGNARO, C.; CANNIATTI-BRAZZACA, S.G.; SPOTO, M.H.F.; VERRUMA-BERNARDI, M.R. Características Físico-Químicas e Sensoriais de Marcas Comerciais de Queijo Mozzarella de Leite de Búfala. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.69, n.3, p.358-63, 2010.

McMAHON, D.J.; PAULSON, B.; OBERG, C. J. Influence of Calcium, pH, and Moisture on Protein Matrix Structure and Functionality in Direct-Acidified Nonfat Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.3754–3763, 2005.

MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. **Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia**. Tecniche Nuove, Milano, 2006.

PASTORINO, A.J.; HANSEN, C.L.; McMAHON, D.J. Effect of pH on chemical composition and structure function relationships of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n 9, p.2751- 1760, 2003.

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Revista Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PICON, A.; ALONSO, R.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. High-Pressure Treatment and Freezing of Raw Goat Milk Curd for Cheese Manufacture: Effects on Cheese Characteristics. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.2820-2830, 2013.

PICON, A.; GAYA, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; RIVAS-CAÑEDO, A.; ÁVILA, M. MUÑEZ, M. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds, texture, and flavor of Hispánico cheese made using frozen ewe milk curds pressed for different times. **Revista Journal Dairy Science**. v.93, p.2896-2905, 2010.

SAMEEN, A.; ANJUM, F.M.; HUMA, N.; KOUSAR, R.; NAWAZ, H. Impact of Fat Levels in Milk on the Composition, Sensory Attributes and Functionality of Buffalo Mozzarella Cheese. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v.45, n.4, 2008.

TEJADA, L.; SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ, R.; VIOQUE, M.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. **Journal of Food Science**. v.67, n.1, p.126-129, 2002.

VAN DENDER, A.G.F. Utilização artesanal de leite de búfala. **Manual Técnico do Instituto de Tecnologia de Alimentos–ITAL**, Campinas. Manual Técnico n.3, 1989, 60p.

VAN HEKKEN, D.L.; TUNICK, M.H.; PARK, Y.W. Effect of Frozen Storage on the Proteolytic and Rheological Properties of Soft Caprine Milk Cheese. **Journal of Dairy Science**. v.88, p.1966-1972, fev. 2005.

VERDINI, R.A.; ZORRILLA, S.E. RUBIOLO, A.C. Effects of the freezing process on proteolysis during the ripening of Port Salut Argentino cheeses. **International Dairy Journal**. v.15, p.363-370, ago. 2004.

CAPÍTULO 3. CONGELAMENTO DA COALHADA FERMENTADA DE LEITE DE BÚFALA E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A PROTEÓLISE E CAPACIDADE DE DERRETIMENTO DO QUEIJO MUÇARELA ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

Resumo – Objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre o derretimento e índice proteolítico da muçarela de búfala. Os tratamentos foram compostos por tempos de congelamento da coalhada fermentada (0, 40, 80, 120 e 160 dias) de leite de búfala e tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala (10, 20 e 30 dias). As amostras dos queijos muçarela foram submetidas a análises de derretimento e índice de proteólise. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5 x 3 e os dados obtidos foram analisados por meio de análise de regressão, adotando-se $\alpha = 0,05$. Não houve efeito do congelamento da coalhada fermentada sobre a capacidade de derretimento dos queijos, porém os tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração influenciaram significativamente no aumento da capacidade de derretimento. A proteólise foi mais rápida nos queijos preparados a partir de coalhada congelada, com a taxa dependendo da duração do armazenamento em temperaturas de congelamento. Pode-se concluir que a utilização de coalhada congelada de leite de búfala na fabricação de queijos muçarela pode ser uma alternativa viável para superar a escassez sazonal do leite de búfala.

Palavras-chave: Sazonalidade, eletroforese, propriedade tecnológica.

Abstract – The objective of this study was to evaluate the effect of the freezing weather curd fermented buffalo milk on melting and proteolysis index of buffalo mozzarella. The treatments consisted of freezing times of curd fermented (0 , 40 , 80 , 120 and 160 days) of buffalo milk and times chilling buffalo mozzarella cheese (10 , 20 and 30 days) . The samples of mozzarella cheese were analyzed for melting and ripening index. The experiment was conducted in 5 x 3 factorial scheme and the data obtained were analyzed using regression analysis, adopting $\alpha = 0.05$. No effect of freezing the fermented curd on the ability to melt the cheese, but the storage time of refrigerated cheeses significantly influenced the increase in melting capacity. The proteolysis was faster in cheese prepared from frozen curd, with the rate depending on the duration of storage in freezing temperatures. It can be concluded that the use of frozen curd buffalo milk in the manufacture of mozzarella cheese can be a viable alternative to overcome seasonal shortages of buffalo milk.

Keywords: Seasonality, electrophoresis, technological property.

3.1 INTRODUÇÃO

O leite de búfala contém 40-60% mais gordura, proteína e cálcio que o leite de vaca, o que proporciona um rendimento industrial superior e por isso é muito utilizado na fabricação de muçarela (ZICARELLI, 2004; ARAÚJO, 2012; HUSSAIN et al., 2012a). No entanto a disponibilidade do leite desta espécie apresenta caráter sazonal, dificultando a oferta dos derivados lácteos em determinadas épocas do ano.

A alternativa tradicionalmente considerada mais adequada para regulação do mercado de queijo muçarela no período de entressafra é o congelamento da coalhada, porém alterações no ciclo de congelamento e descongelamento podem resultar em características indesejáveis nos queijos, incluindo desnaturação das proteínas e dano estrutural da matriz proteica (TEJADA et al., 2002; HUSSAIN et al., 2012a).

Muitas pesquisas têm sido feitas sobre o congelamento de coalhadas em relação às propriedades dos queijos, tais como, coalhada congelada de leite de cabra na fabricação de queijos macios (Picon et al., 2013) e coalhada congelada de leite de ovelha na fabricação de queijo Hispánico (Picon et al., 2010). No entanto, há uma carência de estudos sobre queijo muçarela obtido a partir da coalhada congelada de leite de búfala, fato que deve ser mais explorado, tendo em vista o déficit desse produto no período de entressafra.

A muçarela é um queijo fresco de massa filada originado na Itália. O nome massa filada refere-se ao tratamento exclusivo de plasticização e texturização da coalhada fresca em água quente que dá ao queijo sua estrutura fibrosa característica e propriedades de derretimento (AHMED et al., 2011).

O derretimento é uma característica tecnológica importante e refere-se à facilidade e a extensão com que o queijo poderá derreter quando aquecido (GUNASEKARAN & MEHMET, 2003). A muçarela recentemente fabricada exibe a orientação típica da fibra de proteína e não derrete bem. A hidratação da matriz de proteína e a proteólise que ocorre conjuntamente durante o curto espaço de envelhecimento do queijo muçarela alteram a microestrutura e a textura do queijo (McMAHON et al., 1999). Geralmente um período de maturação de três semanas estocado sob refrigeração é necessário para o derretimento desejado.

A proteólise consiste na degradação das proteínas por enzimas proteolíticas, principalmente as caseínas, da qual resultam peptídeos e/ou aminoácidos livres (WALSTRA et al., 2006). É o mais complexo e, na maioria das vezes, o mais importante dos eventos bioquímicos primários que ocorrem na maior parte dos queijos, o qual interfere tanto no

desenvolvimento da textura, via clivagem da caseína, quanto no sabor, pela formação dos precursores, que posteriormente vão sofrer conversão para compostos aromáticos voláteis (McSWEENEY, 2004; KONGO, 2009).

A proteólise primária pode ser eficazmente avaliada em eletroforese por ureia em gel de poliacrilamida (ureia-PAGE), Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE) e focagem isoelétrica, ao passo que a subsequente formação de peptídeos, denominados proteólise secundária, que é provocada por peptidases de origem microbiana, podem ser determinados por meio de cromatografia líquida em fase reversa de alta eficiência (RP-HPLC), sendo que esta última técnica também permite o isolamento e identificação de uma vasta gama de peptídeos individuais (KONGO, 2009).

Um estudo sobre a extensão e profundidade da proteólise da muçarela produzida a partir de coalhada congelada poderia contribuir para melhor compreensão das mudanças que ocorrem nestes queijos, e propor com segurança a utilização desta alternativa tecnológica. Sendo assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do tempo de congelamento da coalhada fermentada de leite de búfala sobre a capacidade de derretimento e índice de proteólise da muçarela armazenada sob refrigeração.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Obtenção da Matéria-Prima

As amostras de leite de búfala foram coletadas nos meses de setembro, outubro e novembro de 2012, no período da manhã, em uma fazenda localizada no Município de Maiquinique – BA, sob o sistema de ordenha manual e em condições de ordenha higiênica, de fêmeas bubalinas mestiças Jafarabadi x Murrah, alimentadas a pasto (*Brachiaria decumbens*), no período final da lactação.

3.2.2 Processamento dos queijos

O experimento foi conduzido em um Laticínio situado na cidade de Itapetinga – Ba no período de setembro de 2012 a maio de 2013. O volume de leite utilizado para cada repetição variou entre 70 e 100 litros, com padronização em aproximadamente 4,0% de gordura. Para obtenção das coalhadas fermentadas, o leite foi pasteurizado a 65° C/30 minutos, seguido de resfriamento até a temperatura de 35° C. Em seguida, foi feita a adição dos ingredientes, utilizou-se 1,0 g de cultura láctica mesofílica, liofilizada (Fermento DVS-R704 *Chr Hansen*)

constituída pelas espécies *Lactococcus Lactis* subespécie *Cremonis* e *Lactococcus Lactis* subespécie *lactis*, dissolvidos em 250 mL de leite de búfala, 5,0 mL de cloreto de cálcio a 50% e 9,0 mL de coalho (coagulante líquido HÁ-LA® do Brasil - *Chr Hansen* – força 1:3.000). Após repouso de 30 minutos ocorreu à formação do coágulo (massa), que foi cortado (cerca de 1,0 cm de aresta) no sentido vertical e depois horizontal com um auxílio de uma lira. Procedeu-se lentamente a primeira mexedura da massa durante 15 minutos sem aquecimento e depois uma segunda mexedura da massa a 42° C, até se obter uma massa cozida e firme. Foi realizada a dessoragem (retirada do soro) e a coalhada ficou fermentando por um período de aproximadamente 18 horas. Após a obtenção das massas fermentadas, as mesmas foram divididas em cinco blocos de massa aproximadamente iguais, sendo uma delas filada no mesmo dia (controle) e as demais transportadas até o laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde foram congeladas a -20° C até o momento do descongelamento preconizado para cada tratamento para elaboração dos queijos: T1 – sem congelamento da coalhada fermentada (controle); T2 – coalhada fermentada congelada por 40 dias; T3 – coalhada fermentada congelada por 80 dias; T4 – coalhada fermentada congelada por 120 dias; e T5 – coalhada fermentada congelada por 160 dias.

3.2.3 Filagem da massa

As massas congeladas, após descongeladas em seus respectivos tempos e a massa do tratamento controle (massa fresca), foram fatiadas, filadas em água aquecida a 80° C, acondicionadas em formas próprias para muçarela, sendo viradas de 10 em 10 minutos durante 40 minutos. Em seguida os queijos foram colocados em salmoura 20% (m/v) por cerca de uma hora. Após esse período foram retirados da salmoura para posterior secagem sob refrigeração, durante doze horas, sendo embalados a vácuo para posterior análise. Estes, foram estocados sob refrigeração sendo analisados com 10, 20 e 30 dias. As amostras dos queijos foram submetidas a análises de índice de proteólise por método químico e eletroforético e capacidade de derretimento.

3.2.4 Capacidade de Derretimento

A capacidade de derretimento foi determinada por meio da adaptação do método de Schreiber's para queijo processado (Pizaia et al., 2003). Com o auxílio de um cilindro de 36,0 mm de diâmetro a amostra foi cortada em fatias de 7 mm de espessura, desprezando-se a

primeira e a última fatia. Cada fatia foi colocada no centro de uma placa de Petri, tampada e deixada à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram previamente marcadas com quatro linhas dispostas em ângulos de 45°. O diâmetro de cada amostra foi calculado como a média dos diâmetros, nas quatro direções, medidos antes e após o derretimento por 7 minutos em estufa a 107° C. Todas as análises foram feitas em triplicata. A partir dos diâmetros médios, foi calculada a porcentagem (%) de derretimento das fatias de queijo, conforme equação 1.

$$\% CD = \frac{A_f - A_i}{A_i} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

CD = capacidade de derretimento;

A_f = área da fatia após derretimento (calculada com o diâmetro médio);

A_i = área da fatia antes do derretimento (calculada com o diâmetro médio).

3.2.5 Índice de Proteólise

O índice de proteólise foi avaliado por determinações químicas de nitrogênio solúvel a pH 4,6 e em 12% de ácido tricloroacético (TCA) e por método eletroforético.

3.2.5.1 Método químico

Para a avaliação da proteólise dos queijos foi necessário determinar o nitrogênio total (NT), nitrogênio não proteico (NNP) e nitrogênio não caseinoso (NNC).

Para a determinação do NT foi utilizado o método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita por BRASIL (2006). Para determinação do NNP e NNC foi utilizado o método Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela AOAC (1995).

A proteólise foi estimada por meio da relação caseína (C) / proteína verdadeira (PV), expressa em termos de nitrogênio (N) - equivalente de proteína, cujos valores foram obtidos conforme as equações 2, 3 e 4:

$$PV = (NT - NNP) \times 6,38 \quad (2)$$

$$C = (NT - NNC) \times 6,38 \quad (3)$$

$$Proteólise = \frac{C}{PV} \quad (4)$$

A proteólise também foi indicada pelos índices de extensão e profundidade, e esses índices foram obtidos por meio dos cálculos descritos a seguir (ANDREATTA, 2006):

Índice de extensão da proteólise (IEP) conforme, equação 5:

$$\% IEP = \frac{NNC}{NT} \times 100 \quad (5)$$

Índice de profundidade da proteólise (IPP) conforme, equação 6:

$$\% IPP = \frac{NNP}{NT} \times 100 \quad (6)$$

3.2.5.2 Método Eletroforético

As amostras foram transferidas (aproximadamente 20 g) para tubos falcon, congeladas a -80 °C e posteriormente liofilizadas por 72 horas em liofilizador de bancada FreeZone 4,5 L da marca LABCONCO. Depois de liofilizadas foram estocadas a -20 °C, até o momento da eletroforese (EGITO et al., 2006). Para avaliação do perfil eletroforético das proteínas dos queijos, utilizou-se uma cuba para eletroforese vertical da marca Apelex. A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante minigéis de poliacrilamida com concentração de 5% em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com minigéis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS. As amostras (2 mg mL⁻¹) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl, pH 6,8, com 0,1% de SDS e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e acrescidas de e um volume de 20 μL foi, posteriormente, depositado em cada poço do minigel segundo metodologia descrita por Egito et al. (2006) com modificações de Faleiro et al. (2013).

A migração foi realizada com temperatura controlada entre 4 °C, durante 90 minutos, com condições elétricas de 250V, 30 mA e 15 W. O marcador de massa molecular padrão utilizado para identificação das proteínas foi o SDS-PAGE (BIO-RAD), contendo aprotinin (6,5 kDa), lisozima (14,4 kDa), inibidor tripsina (21,5 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), β-galactosidase (116,2 kDa) e miosina (200,0 kDa).

Após o término da corrida, as proteínas foram fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min e, em seguida, coradas com 0,1% (p/v) de Azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% (v/v) de etanol e 2% de TCA, durante 120 min. A descoloração foi realizada *overnight* com solução de 30% (v/v) de etanol e 7,5%

(v/v) de ácido acético (EGITO et al., 2006). Os géis foram escaneados e posteriormente submetidos a uma nova coloração por Nitrato de Prata, segundo protocolo adaptado de Bloom et al. (1987). Os géis foram lavados três vezes com água destilada durante 20 minutos, seguido da adição de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) durante um minuto e nitrato de prata 0,1% (p/v) por 30 minutos, sob agitação e ao abrigo da luz. As proteínas foram reveladas utilizando uma solução de carbonato de cálcio 12% (p/v), 40 µL de tiosulfato de sódio 2% (p/v) e 200 µL de formaldeído. A reação foi parada com solução de ácido acético 1% (v/v), quando foram fotografadas.

3.2.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, em esquema fatorial 5x3, sendo cinco tratamentos (0, 40, 80, 120 e 160 dias de congelamento da coalhada fermentada) e três tempos de refrigeração do queijo processado (10, 20 e 30 dias de armazenamento sob refrigeração). A coalhada fermentada fresca (tempo 0) foi o tratamento controle.

Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010). Os resultados obtidos nas análises laboratoriais foram submetidos à análise de regressão, considerando-se como fonte de variação os tempos de congelamento, os tempos de refrigeração e a interação dos fatores tempos de congelamento e tempos de refrigeração, testados a 5% de significância.

3.3 Resultados e Discussão

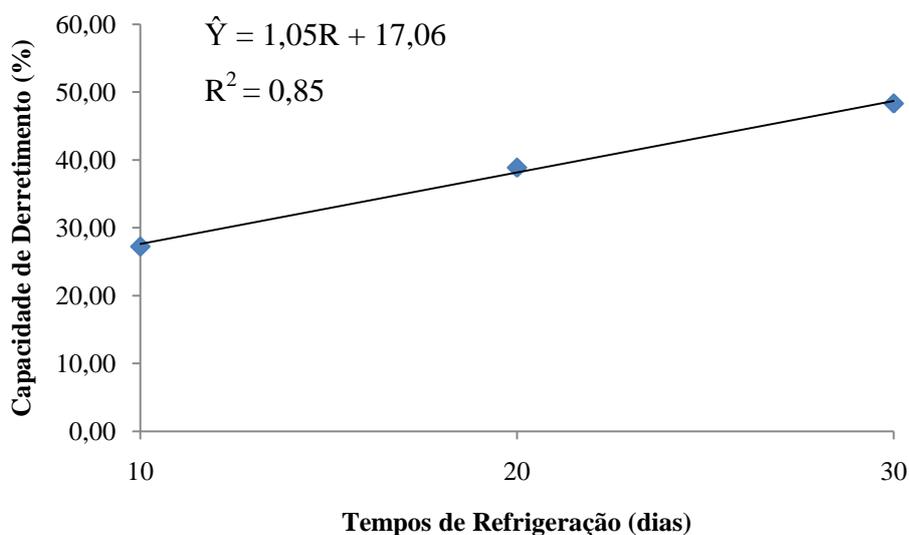
3.3.1 Capacidade de Derretimento

Segundo Chiesa et al. (2009), a capacidade de derretimento (CD) está associada à mudança de fase que ocorre quando o queijo é submetido ao aquecimento, na qual a gordura passa do estado sólido para líquido como consequência da aplicação de energia na forma de calor. Vários fatores podem influenciar a capacidade de derretimento do queijo muçarela como umidade, teor de gordura, conteúdo de sal, quantidade de água livre e proteólise.

Não houve efeito ($P > 0,05$) do congelamento da coalhada fermentada sobre a capacidade de derretimento dos queijos, porém os tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração influenciaram significativamente ($P < 0,05$) no aumento da capacidade de derretimento (Figura 1). Este fato pode ter ocorrido devido principalmente à proteólise ocorrida durante o período de estocagem, pois como a matriz proteica foi degradada, a

capacidade do queijo para manter sua estrutura durante o aquecimento diminui. Segundo Cortez (1999), com a proteólise e intensa desestruturação da rede tridimensional que compõe o queijo, ocorre à quebra da estrutura da matriz proteica, com perceptível aumento da maciez do queijo e liberação da gordura que está no seu interior, aumentando a exsudação de gordura e o derretimento.

Figura 1. Comportamento da Capacidade de Derretimento dos queijos Muçarela de Búfala em função dos diferentes de tempos de estocagem sob refrigeração.



Observou-se o aumento progressivo da capacidade de derretimento dos queijos no decorrer do tempo de estocagem sob refrigeração. Este fato pode ter ocorrido provavelmente em consequência do enfraquecimento da matriz proteica do queijo, que ocorre fundamentalmente em virtude da ação proteolítica do coalho ou coagulante residual. Este evento, denominado proteólise primária, está associado a um aumento da capacidade de derretimento e de retenção de água do queijo, aumento da liberação de óleo livre e redução da firmeza e elasticidade (FOX, 1989). De acordo com Dave et al. (2003) a proteólise presumivelmente a 4° C provoca alguma decomposição na estrutura densa da caseína, resultando um produto com propriedades mais desejáveis de textura e derretimento.

Segundo Kindstedt (1993), o queijo muçarela logo após o seu processamento apresenta dificuldade em derreter, pois nesta fase suas proteínas apresentam alta massa molecular, o que as torna pouco solúveis. Após duas a três semanas de estocagem essas proteínas são hidrolisadas, ficando mais solúveis e aumentando a capacidade de derretimento da muçarela, até a mesma apresentar-se excessiva, tornando o queijo impróprio para o consumo. O mesmo foi observado em estudos realizados por Yun et al. (1993) onde

relataram que a proteólise é causada pela enzima coagulante residual e também por proteases de micro-organismos no queijo durante a maturação e aumento na capacidade de derretimento durante o envelhecimento é altamente associado com um aumento na proteólise, especialmente durante os primeiros 14 dias de maturação.

3.3.2 Índice de proteólise por meio do método químico

Com relação aos diferentes tempos de refrigeração do queijo muçarela de búfala e os tempos de congelamento da coalhada fermentada não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) para os parâmetros proteólise, índices de extensão e profundidade (Tabela 3).

A extensão da proteólise ou índice de maturação, obtido por meio da relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e de nitrogênio total, é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, resultante da degradação da caseína pelo coalho e acumuladas durante a maturação, refletindo, portanto, a composição final e as características sensoriais dos queijos (GARCIA et al., 2009). A extensão da proteólise é um fator indicativo da proteólise primária e ocorre principalmente pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual no queijo, sobre a α_{S1} -caseína e, em menor escala sobre a β -caseína, dando origem a peptídeos de alta e média massa molecular (FOX, 1989).

A profundidade de maturação abrange as substâncias nitrogenadas de baixa massa molecular (aminoácidos, oligopeptídios, aminas, etc.) acumuladas durante o processo de degradação da proteína (GUTIERREZ, 2004).

Tabela 3. Médias dos parâmetros proteólise, índice de extensão e profundidade dos queijos muçarela estocados em diferentes tempos de refrigeração obtidos a partir de coalhada fresca e congelada.

Parâmetros	Tempos de Congelamento (dias)					TR (Dias)	Equação Estimada
	0	40	80	120	160		
Proteólise	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	10	$\hat{Y} = 0,994$
	1,00	0,99	0,98	1,00	0,99	20	$\hat{Y} = 0,992$
	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	30	$\hat{Y} = 0,994$
IEP	2,00	3,15	2,53	2,78	2,73	10	$\hat{Y} = 2,64$
	2,63	2,31	3,57	1,89	2,98	20	$\hat{Y} = 2,68$
	2,50	2,89	2,92	2,33	2,92	30	$\hat{Y} = 2,71$
IPP	2,24	1,89	1,89	2,05	2,02	10	$\hat{Y} = 2,02$
	2,32	1,72	2,23	1,91	1,98	20	$\hat{Y} = 2,03$
	1,72	2,44	1,84	2,10	3,11	30	$\hat{Y} = 2,24$

IEP = Índice de extensão da proteólise; IPP = Índice de profundidade da proteólise; TR = Tempos de refrigeração.

Visto que houve aumento na capacidade de derretimento dos queijos em função dos tempos de refrigeração, constata-se que houve desestruturação da malha proteica e, no entanto, por meio do método químico de determinação da proteólise não foi possível detectar esta diferença. Segundo Veiros (2005), esta técnica permite obter informações condensadas sobre a proteólise, fornecendo informações globais sobre a extensão da mesma e sobre a atividade proteolítica dos vários agentes.

Estes índices são considerados índices brutos e não refletem a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante o processo de maturação (SILVA, et. al., 1999). No entanto, a caracterização completa da proteólise do queijo requer o isolamento, identificação e quantificação das substâncias formadas.

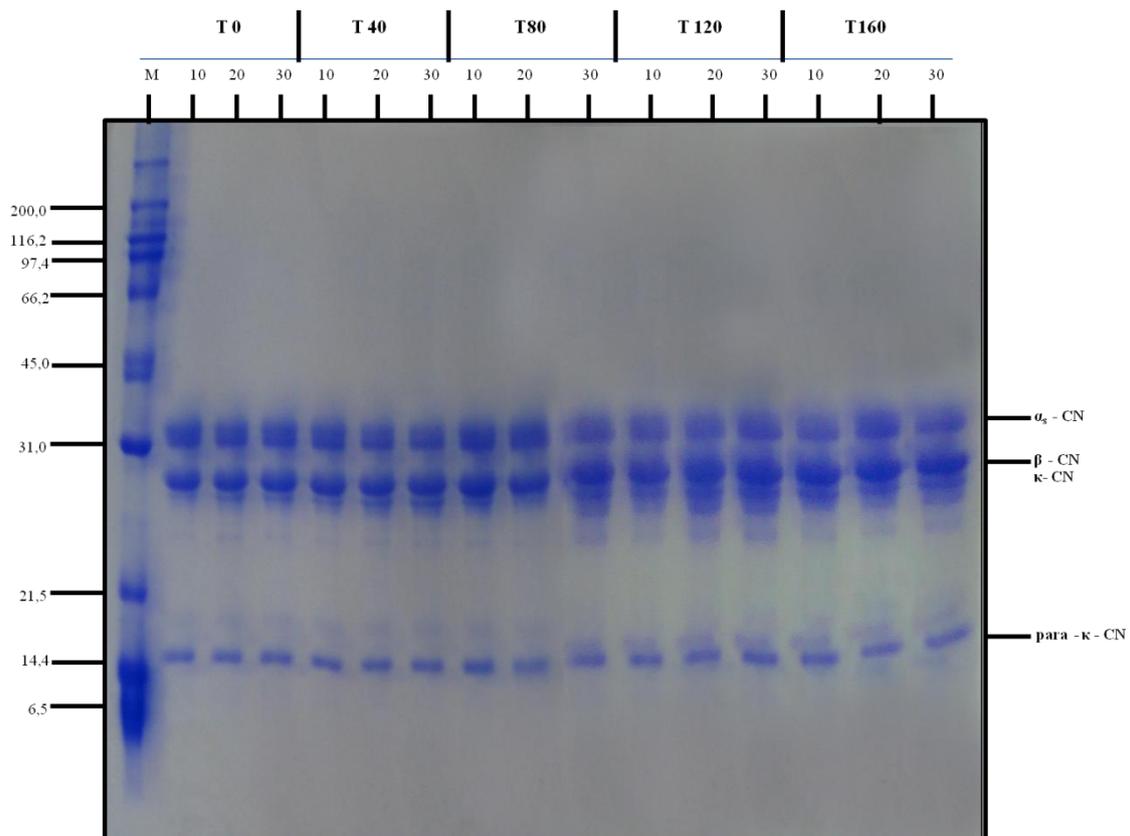
3.3.3 Índice de proteólise por meio do método eletroforético

Por meio da eletroforese foi possível observar as frações proteicas presentes nas amostras de queijo, analisando o tempo de congelamento da massa e o tempo de armazenamento do queijo em função da intensidade da proteólise.

Na Figura 2 está o perfil eletroforético dos queijos estocados em diferentes tempos de refrigeração e fabricados utilizando a coalhada fermentada fresca (T0) e congelada (40, 80, 120 e 160 dias), corados com Azul de Coomassie. A partir de 40 dias de congelamento da

coalhada (T40), foram identificados peptídeos resultantes da degradação proteolítica aos 20 e 30 dias de estocagem dos queijos sob refrigeração. A coalhada congelada por 160 dias apresentou uma degradação proteica já aos 10 dias de estocagem do queijo sob refrigeração e aos 30 dias de estocagem já se observa um leve degradação da β -caseína com o aparecimento de outros peptídeos.

Figura 2. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do queijo muçarela de búfala revelado com Azul de Coomassie. Depositaram-se 20 μ G de proteínas em cada poço. M, massa molecular padrão; **T0** – tratamento sem congelamento da massa fermentada; **T40** – tratamento da massa fermentada congelada por 40 dias; **T80** – tratamento da massa fermentada congelada por 80 dias; **T120** – tratamento da massa fermentada congelada por 120 dias; **T160** – tratamento da massa fermentada congelada por 160 dias, todos os tratamentos analisados nos tempo de 10, 20 e 30 dias de estocagem; α_s -CN, alfa_s-caseína; β -CN, beta-caseína; κ -CN, kappa-caseína; γ -CN, gamas-caseínas.



Foi nítida a visualização do peptídeo para- κ -caseína em todos os tratamentos estudados (tempo de congelamento da coalhada fermentada e tempos de estocagem do queijo sob refrigeração). Segundo Veiros (2005), o principal papel do agente coagulante na

fabricação de queijos é a hidrólise específica da κ -caseína, uma vez que neste processo se destrói a estabilidade coloidal da micela de caseína, ocorrendo à coagulação. A quimosina atua especificamente na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆, originando dois fragmentos: a para- κ -caseína e o glicomacropéptido. A maior parte do glicomacropéptido é eliminado no soro, no entanto, a para- κ -caseína permanece nas micelas de caseínas, ficando incorporada ao queijo.

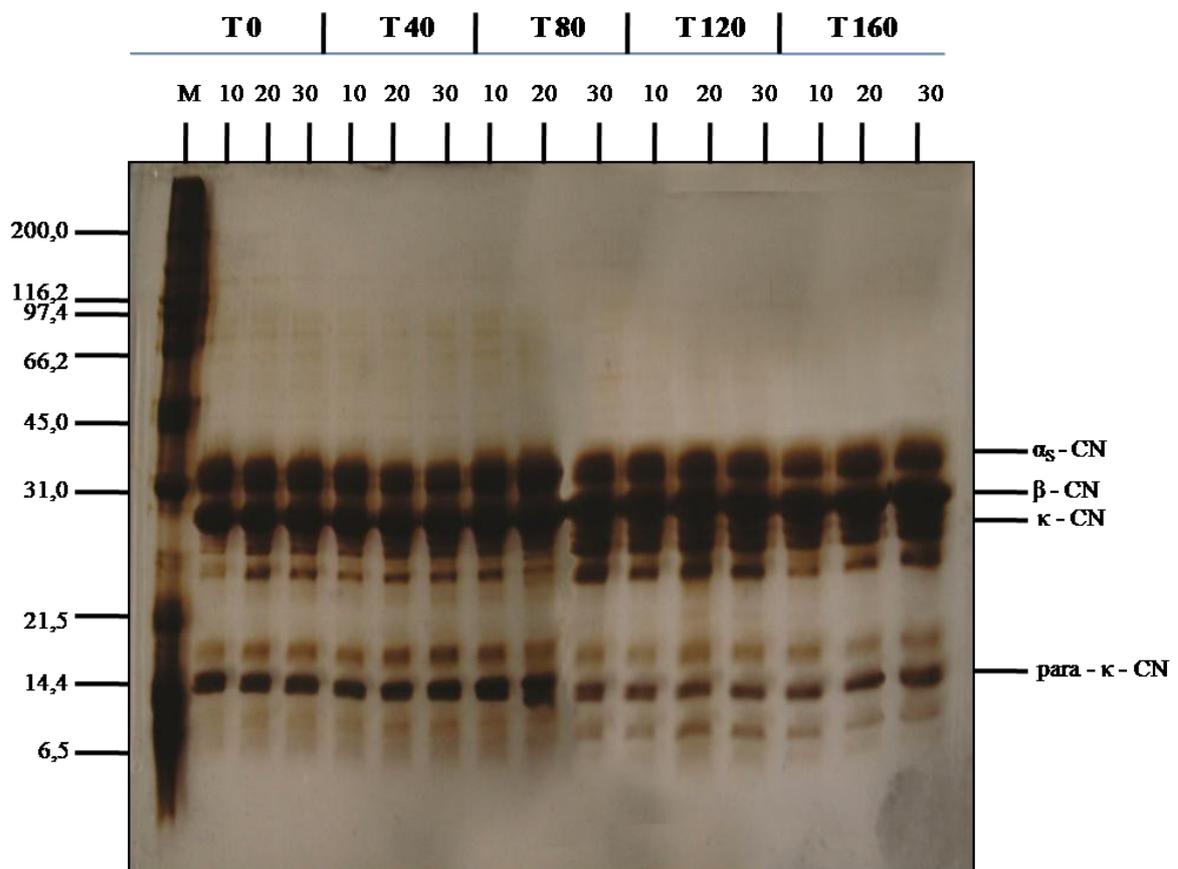
A proteólise durante a maturação de queijos muçarela depende dos agentes proteolíticos ativos e as condições da matriz alimentar, determinadas por sua vez pela tecnologia de fabricação dos queijos (COSTABEL et al., 2007). Vários estudos com queijos Cheddar e Gouda demonstraram que as enzimas do coalho, são as principais responsáveis pela proteólise primária e a produção da maior parte de nitrogênio solúvel a pH 4,6. Em queijos cuja massa é cozida em altas temperaturas, como por exemplo, Gruyère, Muçarela, Parmesão e Emmental, provavelmente as enzimas do coalho são completamente desnaturadas pelas altas temperaturas e, portanto, a contribuição da plasmina à proteólise primária é consideravelmente maior nessas variedades que em queijos Cheddar e queijos do tipo holandês (FOX et al., 2000; PERRY, 2004).

Segundo Lawrence et al. (1987), a taxa de degradação α_1 -caseína está relativamente aumentada, a um valor de pH baixo. Por outro lado, a β -caseína é mais degradada do que a α_1 -caseína a um pH superior a 5,6, provavelmente, como resultado do aumento da atividade da plasmina. Este fato justifica o aparecimento de peptídeos resultantes da hidrólise da β -caseína no presente trabalho, visto que a variação de valor de pH dos queijos obtidos a partir da coalhada fresca e congelada variou entre 5,61 e 5,90.

Alichanidis et al. (1981) relataram um aumento na taxa de hidrólise da caseína, durante a maturação de queijo feito de coalhada congelada. Os autores sugerem que a estrutura da coalhada teria sofrido alterações durante o processo de congelamento, o que pode ter ativado a hidrólise de proteínas prosseguirem a uma taxa mais rápida.

Quando se requer uma coloração mais sensível que detecte concentrações mais baixas de proteína, utiliza-se a coloração por nitrato de prata que chega a detectar nanogramas de proteínas. A partir da análise realizada no gel revelado com Nitrato de Prata (Figura 3) a caracterização eletroforética apresentou maior nitidez na detecção de peptídeos resultante da proteólise, com o aparecimento de novas frações não visualizadas anteriormente.

Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) do queijo muçarela de búfala revelado com Nitrato de Prata. Depositaram-se 20 µG de proteínas em cada poço. PM, peso molecular padrão; **T0** – tratamento sem congelamento da massa fermentada; **T40** – tratamento da massa fermentada congelada por 40 dias; **T80** – tratamento da massa fermentada congelada por 80 dias, **T120** – tratamento da massa fermentada congelada por 120 dias; **T160** – tratamento da massa fermentada congelada por 160 dias, todos os tratamentos analisados nos tempo de 10, 20 e 30 dias de estocagem; α_s -CN, alfa_s-caseína; β -CN, beta-caseína; κ -CN, kappa-caseína; γ -CN, gamas-caseínas.



Nos queijos fabricados com a coalhada fresca (T0) aos 10 dias de refrigeração os peptídeos resultantes da degradação proteica se apresentaram menos intensos quando comparados com os queijos armazenados sob refrigeração com 20 e 30 dias. Nos queijos fabricados com a coalhada fermentada congelada por 40 dias (T40) a partir dos 10 dias de armazenamento do queijo refrigerado já foi possível visualizar o aparecimento destes peptídeos e aos 20 e 30 dias houve uma redução maior da α -caseína indicando assim uma maior degradação desta fração e as κ e os demais peptídeos resultantes da degradação proteica se apresentaram mais acentuados. Nos queijos fabricados com a coalhada fermentada

congelada por 80, 120 e 160 dias (T80, T120 e T160) também foi possível perceber a detecção dos peptídeos, porém nestes tratamentos é possível a visualização de peptídeos desde os 10 dias de estocagem dos queijos sob refrigeração.

O aparecimento destes peptídeos resultantes da degradação proteica no decorrer da estocagem dos queijos sob refrigeração pode justificar o aumento na capacidade de derretimento dos queijos, indicando a proteólise primária que pode ser medida pela degradação da β -caseína.

Segundo Dini (2010), a estrutura primária da β -caseína é susceptível a hidrólise pela protease plasmina, nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28-29, 105-106, e 107-108, produzindo os fragmentos peptídicos γ [γ 1-(β -CN f29-209), γ 2-(β -CN f106-209) e γ 3-(β -CN f108-209)], representando a região C-terminal e 5 proteose-peptonas, representando a região N-terminal. Dessa forma o aparecimento das bandas claramente observadas na coloração por Nitrato de Prata no presente trabalho, indica a hidrólise da β -caseína, provavelmente por ação da plasmina.

Observando-se o tempo de congelamento da coalhada partindo de 80 até 160 dias de congelamento nos respectivos tempos de estocagem dos queijos sob refrigeração não foi observado diferença perceptível quando revelados por Nitrato de Prata. Este comportamento pode ser explicado considerando-se que até 40 dias, as proteínas dos queijos estocados sob refrigeração foram hidrolisadas a peptídeos de peso molecular relativamente elevado. No entanto, em queijos fabricados com a coalhada congelada a partir de 80 dias, a estrutura da coalhada já teria sofrido alterações, o que permitiu que a hidrólise das proteínas prosseguisse mais rapidamente.

Alichanidis et al. (1981) estudaram a possibilidade de produzir queijo com coalhada congelada e armazenada a -20° C durante 1, 2 e 6 meses, acompanhando a decomposição das caseínas do queijo α_s e β durante a maturação por meio da eletroforese. Foi observado que a α_s - caseína foi degradada rapidamente e depois de quatro meses 83,75% foi perdido no queijo de coalhada congelada, enquanto no controle apenas 74,25% foi hidrolisada. A β -caseína foi degradada no mesmo período de 28,33% em queijos experimentais e 12,22% nos controles.

A taxa de degradação das proteínas está fortemente associada com a acessibilidade das enzimas proteolíticas aos substratos do queijo, o qual depende da estrutura e configuração da matriz proteica do queijo (VEIROS, 2005). Segundo Silva et al. (1999), as técnicas de eletroforese se baseiam na separação de proteínas com base na massa molecular, permitindo o acompanhamento da hidrólise da caseína em componentes menores, contribuindo, dessa

forma, para o melhor entendimento dos processos proteolíticos envolvidos na maturação dos queijos. Veloso et al. (2004) utilizaram a técnica de eletroforese em SDS-PAGE para avaliar a autenticidade e a proteólise de queijo e verificaram por meio da análise densitométrica dos resultados eletroforéticos dos queijos de ovelha que a α -caseína decresceu significativamente durante a maturação, enquanto se observou apenas um ligeiro decréscimo da β -caseína. A caseína bovina permaneceu praticamente constante ao longo dos 30 dias de maturação.

3.4 Conclusão

A capacidade de derretimento dos queijos não foi influenciada pelo congelamento da coalhada, no entanto, houve aumento desta propriedade tecnológica em função dos tempos de refrigeração devido a uma provável desestruturação da malha proteica no decorrer da estocagem. Não houve diferença significativa nos índices de extensão e profundidade da proteólise por meio do método químico, não sendo possível detectar as transformações ocorridas na rede proteica durante a estocagem da coalhada congelada por meio da técnica utilizada.

Por meio do método Eletroforético em Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi possível analisar as caseínas constituídas pelas frações proteicas α , β , κ e outros peptídeos resultantes da degradação da β -caseína. A eficiência do método na identificação de peptídeos resultante da proteólise foi mais perceptível no gel revelado com Nitrato de Prata. A proteólise foi mais intensa nos queijos preparados a partir de coalhada congelada, com a taxa dependendo do tempo de armazenamento em temperaturas de congelamento.

A utilização de coalhada congelada de leite de búfala na fabricação de queijos muçarela pode ser utilizada para superar a escassez sazonal do leite de búfala, visto que mesmo havendo proteólise os queijos não apresentaram derretimento excessivo a ponto de torná-lo impróprio para consumo.

3.5 Referências

AHMED, N.S.; ABD EL-GAWAD, M.A.M.; EL-ABD, M.M.; ABD-RABOU, N.S. Properties of Buffalo Mozzarella Cheese as Affected by Type of Coagulant. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**. v.10, n.3 p.339-357, 2011.

ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, A.; TZANETAKIS, N.; VAFOPOULOU, A. Teleme Cheese from Deep-Frozen Curd. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.732-739, 1981.

ANDREATTA, E. Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. 110 p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 2006.

ARAÚJO, K.B.S.; RANGEL, A.H.N.; FONSECA, F.C.E.; AGUIAR, E.M.; SIMPLÍCIO, A.A.; NOVAES, L.P.; JÚNIOR, D.M.L. Influence of the year and calving season on production, composition and mozzarella cheese yield of water buffalo in the State of Rio Grande Do Norte, Brazil. **Italian Journal of Animal Science**. v.11, n.16, p. 87-91 Jan, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, v.2, 474p. 1995.

BLOOM, H.; BEIER, H.S. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Eletroforeses**, v.8, p.93-99, 1987.

CHIESA, M.O.; SATO, R.T.; HARA, E.T.; RENSIS, C.M.V.B. Emprego da metodologia de superfície de resposta para avaliação da capacidade de derretimento de queijo mussarela light. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Paraná, v.11, n.4, p.55-58, 2009.

CORTEZ, M.A.S.; FURTADO, M.M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; MARTINS, J.M. Métodos de Avaliação da Qualidade das Propriedades Funcionais de Queijo Mussarela. **Revista Laticínio Cândido Tostes**, v.54, n.309, p.17-20, jul/ago de 1999.

COSTABEL, L.; PAULLETTI, M.S.; HYNES, E. Proteolysis in Mozzarella Cheeses Manufactured by Different Industrial Processes. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.2103-2112, 2007.

DAVE, R.I.; McMAHON, D.J.; OBERG, C.J.; BROADBENT, J.R. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification. **Journal of Dairy Science**. v.86, n.1, p.114-26, 2003.

DINI, C. M. Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor Indicae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado. **Tese (doutorado)**, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo.

EGITO, A.S.; ROSINHA, G.M.S.; LAGUNA, L.E.; MICLO, L.; GIRARDET, J.M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.932-939, 2006.

FALEIRO, A. S. Caracterização Eletroforética, Composição Centesimal e Propriedades Físicas para a Verificação da Autenticidade da Muçarela de Búfala Comercializada no Estado da Bahia. 2013. 68p. **Dissertação (mestrado)**, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia.

FOX, P.F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, Aspen, 2000. 587 p.

FOX, P. F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, n 6, p.1379-1400, 1989.

GUNASEKARAN, S.; MEHMET, A.K.M. **Cheese rheology and texture**. Boca Raton: CRC Press, 2003. 437p.

GARCIA, G.A.C.; MORETTI, B.R.; GOMES, R.G.; CASAROTTI, S.N. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina. **Brazilian Journal of Food Technology**. VII BMCFB, junho, 2009.

GUTIERREZ, E.M.R.; DOMARCO, R.E.; SPOTO, M.H.F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Revista Food Science and Technology**. Campinas, v.24, n.4, p.596-601, out/dez. 2004.

HUSSAIN, I.; YAN, J.; GRANDISON, A.S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: 2. Curd yield, overall quality and casein fractions. **Food Chemistry**, v.135, p.1404-1410, 2012a.

HUSSAIN, I.; GRANDISON, A.; BELL, A. Rheology of rennet induced curd made from buffalo milk. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.22, p.324-328, 2012b.

LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Symposium; Cheese Ripening Technology - Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.7, p.1748–1760, ago. 1987.

KINDSTEDT, P.S. Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v.33, n.2, p.167-187, 1993.

KONGO, J.M.; GOMES, A.; MALCATA, F.X.; McSWEENEY, P.L.H. Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of Sao Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). **Food Chemistry** v.112, p.131–138, 2009.

McMAHON, D.J.R.L.; FIFE, C.J.; OBERG. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. **Journal of Dairy Science**. v.82, p.1361–1369, 1999.

McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**. v.57, n.2/3, p.127-144, 2004.

PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Revista Química Nova**, v. 27, n.2, p.293-300, 2004.

PICON, A.; ALONSO, R.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. High-Pressure Treatment and Freezing of Raw Goat Milk Curd for Cheese Manufacture: Effects on Cheese Characteristics. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.2820-2830, 2013.

PICON, A.; GAYA, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; RIVAS-CAÑEDO, A.; ÁVILA, M. MUÑEZ, M. Proteolysis, lipolysis, volatile compounds, texture, and flavor of Hispánico cheese made using frozen ewe milk curds pressed for different times. **Revista Journal Dairy Science**. v.93, p.2896-2905, 2010.

PIZAIA, P.D.; SPADOTI, L.M.; NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; ROIG, S.M. Composição, proteólise, capacidade de derretimento e formação de “blisters” do queijo mussarela obtido pelos métodos tradicional e de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.3, p.485-491, 2003.

SILVA, A.; VAN DENDER, A.G.F.; BALDINI, V.L.S. Perfil Eletroforético do Queijo Tipo Prato Obtido com Incorporação de Enzimas Proteolíticas. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.54, n.309, Juiz de Fora, jul/ago. p151-156, 1999.

TEJADA, L.; SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ, R.; VIOQUE, M.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in sheep milk cheese. **Journal of Food Science**. v.67, n.1. p.126-129, 2002.

VEIROS, C.B.R. Contributo para a Caracterização do Queijo Terrincho: Estudo da Proteólise e Avaliação da Autenticidade por HPLC/UV, 2005, 145 p. **Dissertação (mestrado)** em Controle de Qualidade, Universidade do Porto, Porto.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; PERES, A.M.; MENDONÇA, A.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Evaluation of cheese authenticity and proteolysis by HPLC and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. **Revista Food Chemistry**. p. 289-295, 2004.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**. CRC, Second Edition, USA, 2006.

YUN, J.J.; KIELY, L.J.; KINDSTEDt, P.S.; BARBANO, D. M. Mozzarella cheese: impact of coagulant type on functional properties. **Journal of Dairy Science.** v.76, p.3657–3663, 1993.

ZICARELLi, L. Buffalo Milk: Its properties, Dairy yield and Mozzarella Production. **Veterinary Research Communications.** v.28, p.127-135. 2004.